Cu^{2+}, Zn^{2+} und Co^{2+} in Rinder-Erythrocuprein

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Jürgen Hartmann
aus Weikersheim

1974

r.t. 222

Cu^{2+}, Zn^{2+} und Co^{2+} in Rinder-Erythrocuprein

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Jürgen Hartmann
aus Weikersheim

1974

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1974

Dekan: Prof. Dr. E. Bayer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Guglielmi

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Weser im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Weser danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche. Durch Sachbeihilfen an Prof. Weser hat die Deutsche Forschungsgemeinschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Den Herren Prof. Dr. G. Jung, Dr. P. Krauss vom Institut für Organische Chemie und Herrn Doz. Dr. U. Weber vom Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen möchte ich an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und wertvollen Hinweise danken.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Arbeitskreises.

Frau E. Lücke und Herrn Dr. J. Arndt vom Mineralogischen Institut der Universität Tübingen danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der photographischen Kristallaufnahmen.

Dem Direktor des Physiologisch-chemischen Instituts, Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel sei für die Bereitstellung von Institutseinrichtungen sowie seiner Unterstützung bei der Promotion gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	
1.1	Die Funktion der Metallionen in Metallproteinen	1
1.2	Kupfer-Proteine	10
1.3	Erythrocuprein und die Metallbindung von Kupfer und Zink	12
1.4	Engeres Thema der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	
2.1	Chemikalien	19
2.2	Geräte	20
2.3	Isolierung von Rinder-Erythrocuprein	21
2.4	Kristallisierung von Rinder-Erythrocuprein	22
2.5	Präparation von Apoerythrocuprein durch Gelfiltration	23
2.6	Prüfung des Apoerythrocupreins auf gebundenes EDTA	24
2.7	Rekonstitutionsversuche von Apoerythrocuprein mit Metallionen	25
2.8	Darstellung von Cu(I)-Apoerythrocuprein	27
2.9	Präparation von Kobalt-Erythrocuprein	28
2.10	Konzentrierungsverfahren	28
2.11	Synthese von Kobalt-Aminosäure-Komplexen	29
2.12	Synthese von Polyäthylenimin-Histidin als Modellkomplex für Erythrocuprein	29
2.12.1	Kupplungsreaktion	29
2.12.2	Abspaltung der Nitrophenylreste	32
2.12.3	Abspaltung der BOC-Schutzgruppe	32
2.13	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von verschiedenen Metallkomplexen des Apoerythrocupreins	32
2.14	Proteinanalyse	33
2.15	Metallanalyse	34
2.16	Analytische Polyacrylamid Disk-Elektrophorese	35
2.17	Polyacrylamid-Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat	35

		Seite
2.18	Circulardichroismus-Messungen	36
2.19	Elektronenspinresonanz-Messungen	37
2.20	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	37
3.	Ergebnisse	
3.1	Kristallisierung von Rinder-Erythrocuprein	40
3.2	Prüfung des Apoerythrocupreins auf gebundenes EDTA	45
3.3	Rekonstitutionsversuche von Apoerythrocuprein	46
3.3.1	Einbau von Kupfer(II) und Zink(II)	46
3.3.2	Einbau von Kupfer(I)	50
3.4	Der Einfluß von Kupfer und Zink auf die Stabilität des Erythrocupreins	51
3.5	Enzymatische Aktivität partiell und vollständig rekonstituierter Metallkomplexe des Apoerythrocupreins	54
3.6	Kobalt-Erythrocuprein	57
3.6.1	Präparation	57
3.6.2	Absorptionsspektroskopie im Sichtbaren- und UV-Bereich	59
3.6.3	Circulardichroismus-Spektrum	60
3.6.4	Elektronenspinresonanz-Messungen	63
3.7	Kobalt-Apoerythrocuprein	65
3.8	Röntgenphotoelektronenspektroskopie von verschiedenen modifizierten Cupreinen	67
3.9	Polyäthylenimin-Histidin-Cu(II)-Komplex als Enzymmodell	75
3.9.1	Synthese	75
3.9.2	Abspaltung der Nitrophenylgruppen	76
3.9.3	Der Cu(II)-Komplex des Polyäthylenimin-Histidins; enzymatische Aktivität	77
4.	Diskussion	
4.1	Kristallisierung von Erythrocuprein	78
4.2	Apoerythrocuprein und Rekonstitution mit Kupfer und Zink	78
4.3	Enzymatische Aktivität der Metall-Apoerythrocuprein-Komplexe	84

Seite

4.4 Kobalt-Erythrocuprein 86
4.5 Röntgenphotoelektronenspektroskopie 92
4.6 Polyäthylenimin-Histidin-Kupfer-Komplex 96

5. Zusammenfassung 98

Literaturhinweise 101

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0036

EINLEITUNG

1 Die Funktion der Metallionen in Metallproteinen

Die essentielle Bedeutung der Metallproteine im Stoffwechselgeschehen ist seit langem bekannt. Sie übernehmen im Organismus wichtige Funktionen wie z.B. den Transport von Sauerstoff (Hämoglobin, Hämocyanin), die Speicherung von Metallionen (Fe(III) im Ferritin) und sind als Metallenzyme an katalytischen Vorgängen beteiligt (Redox-Systeme, Gruppenübertragung, hydrolytische Prozesse) (60,102).

Um die Wirkungsweise der Metallproteine erklären zu können, d.h. Einblick in die Vorgänge auf molekularer Ebene zu erhalten, ist es notwendig, Untersuchungen zur biologischen Funktion und zur Struktur durchzuführen. Hierfür ist die Aufklärung der Primärstruktur, evtl. Proteinuntereinheiten und vor allen Dingen der Bindungsstelle des Metalls im Protein von Bedeutung. Das Metall bildet meist zusammen mit seiner näheren Umgebung das "aktive Zentrum" und ist an eine durch besondere Konformation der Liganden ausgezeichnete Stelle gebunden.

Eine Möglichkeit, die Metallbindung in Proteinen zu untersuchen, besteht darin, daß man von der Struktur her bekannte niedermolekulare Metallkomplexe heranzieht und aus physikalisch-chemischen Eigenschaften Zusammenhänge zu finden hofft. Obwohl im allgemeinen solche Komplexe nur sehr bedingt als Modelle dienen, können doch immer

wieder für beide geltende Beziehungen gefunden werden. So nähern sich bei der Denaturierung von Metallproteinen oft die physiko-chemischen Daten denen von bekannten Metallkomplexen an (143).

In der nativen Form der Proteine ergeben sich meist abweichende Ergebnisse. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß die Metalle in der Proteinumgebung anders als in Modellkomplexen vorliegen müssen. Physikalische und chemische Eigenschaften weisen auf eine asymmetrische Umgebung der Metallionen hin. Durch diese Asymmetrie entsteht ein konformativ gespannter Zustand, der als "entatic state" bezeichnet wird. Der atypische Charakter der Metallumgebung zeigt sich bei physikalisch-chemischen Meßmethoden, wie Absorptions- Circulardichroismus-(CD)- und MCD-Spektroskopie, in magnetischen Eigenschaften und Redoxpotentialen. Es wird angenommen, daß dieser Zustand dazu dient, die chemische Umsetzung des gebundenen Substrats zu erleichtern. Die Energie des "entatic state" scheint hoch genug zu sein, um die erforderliche Aktivierungsenergie zu überwinden (11, 78, 80, 92, 113, 143).

Auffallend bei Metallenzymen ist die Beteiligung von Übergangselementen als Metallkomponente. Sie sind in der Lage, ihre Wertigkeit leicht zu ändern. Hinzu kommt, daß ihre z.T. unbesetzten d-Bahnfunktionen in

die äußeren Bereiche der Atome und Ionen hinausragen. Die Elektronen in den d-Orbitalen werden durch die Umgebung des Ions beeinflußt und wirken selbst auf ihre Umgebung ein.

Zu den wichtigsten Metallen, die in Metallproteinen vorkommen, gehören Fe, Cu, Zn, Co, Mn, Mo und V. Sie sind komplex gebunden und ihre Liganden werden von Aminosäuren, H_2O, Coenzymen oder z.B. im Fall des Hämoglobins und Myoglobins von einem Porphyrinsystem in Verbindung mit Histidin geliefert. Ligandenatome sind meist O, S und N, also Atome, die ein freies Elektronenpaar besitzen.

Im Zusammenhang mit der Wechselwirkung zwischen Metallion und Proteinkomponente werden folgende Mechanismen diskutiert, soweit es sich um Metallenzyme handelt (102).

a) Das Metallion kann an der Bindung von Substrat oder Cofaktoren oder beiden teilnehmen.

b) Es kann den gebildeten Enzym-Substrat-Komplex aktivieren oder stabilisieren.

c) Die unter a) und b) genannten Wechselwirkungen können gemeinsam auftreten.

d) Metallionen können Aminosäure-Seitenketten so koordinieren, daß die Sekundär- und Tertiärstruktur beeinflußt wird und katalytisch aktive Konfigurationen gebildet werden.

e) Durch eine Änderung des Oxidationszustandes des Metallions während enzymatischer Reaktionen können Elektronen übertragen werden.

Eine Entscheidung, welche dieser verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten zutrifft, kann bei den meisten Metallenzymen noch nicht getroffen werden.
Aus all den angeführten Aspekten kann entnommen werden, daß die biochemische Aktivität von Metallenzymen entscheidend von der Koordinationssphäre der Metallionen bestimmt wird. Deshalb wird versucht, auf den verschiedensten Wegen Aufschlüsse über die Liganden zu erhalten, die das Metallion im aktiven Zentrum des Enzyms umgeben. Dazu werden chemische und physikalische Methoden herangezogen.
Zunächst ist die Atomabsorptionsspektroskopie zu nennen, die es erst in neuerer Zeit ermöglichte, die geringen Metallkonzentrationen, wie sie in den Metallproteinen vorliegen, zu erfassen. Zur Strukturuntersuchung werden vor allem die Absorptionsspektren der Moleküle im Sichtbaren und UV, die chiroptischen sowie die magnetischen Eigenschaften der Elektronen und Kerne herangezogen.

Seit kurzem ist es auch möglich, die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) (14, 15, 76, 132) auf biochemische Probleme anzuwenden. Die Methode ist zur Bestimmung der Bindungsenergien aller Elemente außer Wasserstoff und Helium geeignet. Bei der Anwendung auf Metallproteine liefert sie Informationen über die Oxidationsstufen von Liganden und Metallionen. Am günstig-

sten verhalten sich die Übergangsmetalle, da sie außer einem meist großen Bereich der chemischen Verschiebung oft auch noch charakteristische Aufspaltungen der Linien zeigen. Schwefelhaltige Verbindungen eignen sich besonders für XPS-Messungen (76, 131).
Die ersten Metallenzyme, die mit dieser Methode untersucht wurden, waren Nicht-Häm-Eisen-Proteine (76, 79). Hier konnte eine Wechselwirkung des Eisens mit den Schwefelatomen der Liganden festgestellt werden. Daraus wurde auf eine Assoziation von Eisen mit Schwefel geschlossen, was in Übereinstimmung mit Röntgenstrukturuntersuchungen an diesen Proteinen (9) sowie mit Elektronenspinresonanzmessungen (138) steht.

Die Röntgenstrukturanalyse liefert bei weitem die besten Informationen über die geometrische Anordnung der Atome im Gesamtmolekül von Metallproteinen. Sie kann allerdings nur mit kristallisierten Proben durchgeführt werden und Proteinkristalle sind teilweise sehr mühsam zu erhalten. Trotz dieser Schwierigkeit konnte die Struktur von verschiedenen Metallproteinen inzwischen auf diese Weise aufgeklärt werden (Hämoglobin (71, 109), Cytochrom c (31), Carboanhydrase (48), Carboxypeptidase A (83, 84)).
Im Fall des Zink-Proteins Carboxypeptidase A gelang die röntgenkristallographische Aufnahme eines Modell-Substrats (Gly-Tyr), und es konnte festgestellt werden,

daß Zink direkt am Spaltungsprozess beteiligt ist. So elegant die Methode ist, so aufwendig und langwierig ist sie auch. Für die Analyse eines Proteins mit einem Molekulargewicht um 30 000 werden z.B. etwa zwei Jahre benötigt. Deshalb ist es notwendig, weitgehend auf die klassischen Methoden der Strukturaufklärung sowie auf die physiko-chemischen Verfahren zurückzugreifen. Bei der Interpretation ist jedoch stets zu bedenken, inwieweit die Verhältnisse der isolierten Systeme mit denen in vivo übereinstimmen.

Die besondere Funktion des Metalls im Proteinverband wird deutlich, wenn dieses entfernt, das Holoprotein also in ein Apoprotein überführt wird. Dabei werden die Proteine entweder irreversibel verändert oder sie bleiben strukturell stabil. Die biologische Aktivität geht durch diese Behandlung meist verloren.
Auf diese Weise ist es möglich, den Einfluß des Metalls auf das Apoprotein sowohl in Bezug auf seine enzymatische als auch strukturelle Funktion zu untersuchen. Bei Zugabe der entsprechenden Metallionen kann oft eine teilweise oder weitgehende Reaktivierung erreicht werden (69).
Die enzymatische Aktivität kann aber keinesfalls als alleiniges Kriterium für die Nativität eines Metallproteins gelten. Erst wenn alle Homogenitätskriterien und physiko-chemischen Eigenschaften wieder vollständig

zurückerhalten werden, ist die Rekonstitution erfolgreich.

Bei Kupfer-Apoproteinen ist es manchmal schwierig, Rekonstituierungsversuche mit Cu^{2+} durchzuführen, d.h. Cu^{2+} wird nicht spezifisch an das Protein gebunden. Die so erhaltenen Produkte besitzen nur wenig oder überhaupt keine enzymatische Aktivität oder strukturelle Ähnlichkeit mit den jeweils nativen Proteinen. Durch die Verwendung von Cu(I) als Acetonitrilkomplex, einer wasserlöslichen Verbindung, konnten jedoch z.B. mit Apohämocyanin (85) und mit metallfreier Cytochrom c-Oxidase (86) Erfolge erzielt werden. Die Proteine konnten auf diese Weise in einen weitgehend nativen Zustand überführt werden.

Das Entfernen der Metallionen aus dem Proteinkomplex geschieht entweder durch eine Erniedrigung des pH-Wertes in der Proteinlösung oder durch Komplexbildner wie z.B. Cyanid, EDTA, Mercaptoäthanol oder 1.10-Phenanthrolin während eines Dialyseverfahrens. Eine elegantere Methode, durch die auch bessere Ergebnisse erzielt werden, ist die säulenchromatographische Auftrennung von Metallionen und Protein in einem Schritt, wobei das Säulenmaterial mit einer der oben genannten komplexbildenden Substanzen äquilibriert wird (35, 55, 149). Die Metallionen werden auf Grund der hohen Komplexbildungskonstanten dieser Reagenzien aus ihrer Proteinumgebung entfernt. Dabei kann es vorkommen, daß der

Komplexbildner mit reaktiven Gruppen des Proteins eine chemische Verbindung eingeht, die bei Rekonstitutionsversuchen mit Metallionen durch zusätzliche Metallbindung oder strukturelle Veränderungen Fehlergebnisse zur Folge hätte (142).
So kann z.B. EDTA mit den Serinresten des Apoenzyms verestert werden. Es ist deshalb erforderlich, das Apoprotein durch markierte Komplexreagenzien auf evtl. Kontaminationen zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit, Informationen über Metallbindungsstellen im Protein zu erhalten, ist die Substitution von schlecht erfaßbaren gegen spektroskopisch aktive Metallionen.
Zink z.B., das in einer großen Anzahl von Metallproteinen als funktioneller und struktureller Bestandteil enthalten ist, hat als Zn(II)-Ion eine vollbesetzte 3d-Schale. Es ist deshalb diamagnetisch und durch das Fehlen von d→d-Übergängen spektroskopisch inert. Co(II) dagegen, zeigt als $3d^7$-Ion d→d-Übergänge hoher Intensität und daher Absorptionsspektren im Bereich von 500 - 650 nm, sowie paramagnetische Eigenschaften. Beide Eigenschaften sind sehr sensitiv gegenüber Veränderungen (Lösungsmittel, Anionen, pH-Wert) in der Koordinationssphäre des Co(II)-Ions. In anorganischen Co(II)-Komplexen können Art und Zahl der Liganden, Koordinationsgeometrie, Bindungslängen und

Bindungsenergien mit relativer Sicherheit aus optischen Spektren, ESR-, NMR- und Suszeptibilitätsmessungen ermittelt werden (26). Analogschlüsse werden auf Kobalt-Enzyme übertragen.

Die Co(II)-Carboanhydrase ist das in dieser Hinsicht am besten untersuchte Enzym (21, 22, 78, 81, 82, 113). Das Protein hat noch etwa 50% der biologischen Aktivität des natürlich vorkommenden Zink-Enzyms. Das Kobalt liegt, wie aus oben genannten physikalischen Messungen gefolgert wird, pseudotetraedrisch koordiniert vor, wobei drei der vier Liganden von N-Atomen aus dem Protein stammen. Durch 2 Å - Röntgenstrukturdaten konnte diese Annahme bestätigt werden. Hiernach ist Zink über drei Histidin-Stickstoffatome an das Protein gebunden. Die vierte Koordinationsstelle ist für das Lösungsmittel und den Substratangriff frei zugänglich.

Das Beispiel zeigt, daß der Metallionenaustausch unter Umständen ein wertvolles Werkzeug zur Aufklärung von Metallbindungsstellen in Proteinen darstellt. Im Falle der Zink-Proteine lassen sich teilweise auch andere bivalente Metallionen einbauen, aber nur die Substitution durch Kobalt erhält weitgehend die Eigenschaften des unbehandelten Enzyms.

Die Substitution erfolgt entweder durch Herstellung des Apoproteins und anschließende Rekombinierung mit Kobalt oder direkt durch Verdrängungsdialyse des nativen Proteins gegen Kobalt(II) im Überschuß.

2 Kupferproteine (87, 106)

Zu den biochemisch bedeutendsten Metallproteinen gehören die Kupferproteine. Isaka (68) berichtete über die Oxidaseaktivität von Kupferenzymen. Sie sind im Organismus weit verbreitet und an wichtigen Reaktionen beteiligt, wie z.B. an der Zellatmung (Cytochromoxidase), dem Metabolismus von Aminen (Aminoxidasen), dem Sauerstofftransport bei Mollusken (Hämocyanin). Andere Kupferproteine haben Ferroxidasewirkung (Caeruloplasmin) oder übernehmen das Abfangen toxischer Radikale (Erythrocuprein).
Obwohl in neuerer Zeit die Untersuchung von Kupferproteinen intensiviert wurde, ist die Koordinationssphäre des Kupfers und das Verständnis ihrer Wirkung noch wenig bekannt (91).
Manche niedermolekularen Kupferkomplexe und Kupfer-Aminosäurekomplexe haben Katalase-, Peroxidase- und Superoxid-Dismutase-Aktivität und können als Modellkomplexe zur Charakterisierung der Kupfer-Bindungsstellen herangezogen werden (61, 133), jedoch ist ein Rückschluß auf ein natives Kupferprotein selten möglich.

Kupfer kann als Cu(I) oder Cu(II) in biologischen Systemen vorliegen. Cu(II) ist aber in Gegenwart vieler biologischer Liganden das stabilste Kupferion. Die bevorzugte Koordinationszahl ist vier, und die Komplexe liegen meist quadratisch planar vor. Zwei schwächer gebundene Liganden können senkrecht zur Quadratebene stehen, so daß eine hexagonale Anordnung resultiert (60).

Alle mononuklearen Cu(II)-Komplexe sind paramagnetisch und haben die Spinzahl 1/2. High- und low-spin-Formen des Cu(II) in Kupferproteinen konnten nicht nachgewiesen werden.

Cu(II)-Komplexe sind farbig. Dabei bestimmt die Natur der umgebenden Liganden und die Komplexgeometrie die Größe des Extinktionskoeffizienten. Bei niedermolekularen Cu(II)-Komplexen liegt der Extinktionskoeffizient bei 100 M^{-1} cm^{-1}. Bei Komplexen mit gestörter Geometrie wie z.B. $Cu(II)(Gly)_2$ und $Cu(II)(Gly)_4$ ist eine beachtliche Farbvertiefung festzustellen (46). "Blaue Kupferproteine" haben Extinktionskoeffizienten von 500 $M^{-1}cm^{-1}$ und höher.

Die Intensitätsunterschiede liegen z.T. darin, daß d→d-Übergänge in hochsymmetrischen Komplexen schwach sind. Wenn die Umgebung des Zentralatoms nicht symmetrisch ist, kommen einzelne Übergänge durch Vermischung von d-Orbitalen mit p-Orbitalen vor, obwohl es eigentlich verbotene Übergänge sind.

Absorptionsbanden hoher Intensität rühren daher, daß Ladungsübergänge von einem vorzugsweise im Ligandenbereich liegenden Orbital auf ein dem Metallion zugeordnetes Orbital vorkommen. Sie werden als charge-transfer-Banden bezeichnet.

Cu(II) bildet vornehmlich mit N-Liganden Komplexe, wie es in den "blauen Kupferproteinen" der Fall ist. Die unregelmäßige Geometrie des Protein-Metall-Komplexes ist wahrscheinlich eine Folge der Unvereinbarkeit der strukturellen Anforderungen des Proteins mit denen des Metallions.

3 Erythrocuprein und die Metallbindung von Kupfer und Zink

Die Cupreine sind Metallproteine, die Kupfer und Zink enthalten und aus verschiedenen tierischen und pflanzlichen Geweben isoliert und charakterisiert wurden (3, 6-8, 12, 13, 17, 18, 23-25, 36, 37, 47, 56, 57, 70, 73, 77, 88-90, 100, 101, 104, 110-112, 119-124, 127, 130, 136, 137, 140, 141, 147-158).

In neuerer Zeit konnten sie auch in Saccharomyces cerevisiae (51, 154), Streptococcus mutans (144), Neurospora crassa (97, 116) und Fusarium oxysporum (116) nachgewiesen werden.

Unter diesen löslichen Metallproteinen, die alle ein Molekulargewicht von 32 000$\pm$2 000 besitzen, besteht eine auffallende Ähnlichkeit. Nach der von McCord und Fridovich (23-25) gefundenen enzymatischen Aktivität, der Disproportionierung des Superoxid Anions in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, wurden diese Metallenzyme auch als Superoxid-Dismutasen bezeichnet. Inzwischen wurde die enzymatische Funktion des Enzyms Gegenstand eingehender Untersuchungen (5, 47, 59, 75, 93, 96-99, 103, 107, 114, 115, 120, 144, 145, 150, 152).

Von Fee und Teitelbaum (38) wurde eine Schutzfunktion von Biomembranen gegen die oxidative Zerstörung an Hand der Peroxidation von Erythrozyten festgestellt. Zimmermann et al. (159) untersuchten diesen Effekt bezüglich der Peroxidation der inneren Membranen von

Rattenlebermitochondrien. Ob aber $O_2^{\cdot-}$ während der oxidativen Zerstörung der Membranen dem tatsächlichen Substrat entspricht, ist zweifelhaft. Neue Studien lassen vermuten, daß eine weit wichtigere Reaktion von dem Enzym katalysiert wird, nämlich das Abfangen des für die Zelle hochtoxischen Singulett-Sauerstoffs ($^1\Delta_g O_2$) (43, 108, 157).

Über die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten und die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Sauerstoffs geben einige Arbeiten Auskunft (1, 10, 28, 34, 50, 53, 54, 126).

Es wurde berichtet, daß Singulett-Sauerstoff an biochemischen Prozessen beteiligt ist (2, 19, 29, 30, 43, 61).

Das hier untersuchte Protein, das aus Erythrozyten isoliert wurde, wird nach seiner Herkunft als Erythrocuprein bezeichnet. Einen umfassenden Überblick über die in den letzten Jahren gewonnenen Ergebnisse über strukturelle Aspekte und die biologische Funktion des Metallproteins gibt Ref. 157.

Obwohl das Erythrocuprein eines der z.Z. meist untersuchten Kupferproteine ist und schon recht gut charakterisiert ist, weiß man noch verhältnismäßig wenig über die Bindungsstellen der beiden Metallionen Cu^{2+} und Zn^{2+}. Auch eine kürzlich veröffentlichte Röntgenaufnahme des Proteins (117) gibt hierüber noch keinen Aufschluß.

Das Apoprotein wurde von Weser et al. (151) eingehend charakterisiert und der Einfluß der Metallionen durch Rekonstitutionsversuche ermittelt. konnte eine weitgehende Nativität bezüglich der spektroskopischen, elektrophoretischen und enzymatischen Eigenschaften erhalten werden, jedoch waren die ESR-Daten noch von denen des nativen Proteins abweichend.

Die "nativen" Eigenschaften werden hauptsächlich von Cu^{2+} bestimmt, wobei Zn^{2+} eine kooperative Wirkung zeigt.

Aus Anionen-Bindungsversuchen mit Azid und Cyanid wird durch Verfolgung der optischen Titration, ESR- und Kernmagnetische Relaxationsdispersions-Messungen vermutet, daß mindestens vier Bindungsstellen unterschiedlicher Natur für Anionen im Protein vorliegen (37, 49, 122). Diese kann man in zwei Gruppen einteilen. Zwei Azid-bindende Stellen werden dem Zink zugeschrieben und zwei Cyanid-bindende Stellen dem Kupfer. Es kann nicht entschieden werden, ob Cu^{2+} und Zn^{2+} möglicherweise über einen gemeinsamen Liganden gebunden sind. Eine Nachbarschaft der beiden Metallionen wird nicht ausgeschlossen, da die teilweise Substitution des Zink durch Kobalt eine Reduktion des Cu(II)-ESR-Signals durch dieWechselwirkung beider paramagnetischer Ionen hervorruft (16).

Aus ESR-Messungen wird weiter vermutet, daß die Cu-Bindungsstellen äquivalent und rhombisch sind.

Ligandenaustauschversuche führen zu der Annahme, daß die Cu-Bindungsstelle aus drei N-Atomen besteht, die starke Liganden darstellen und einem vierten schwächeren Liganden, der leicht mit Anionen ausgetauscht werden kann. Der 1 : 1 Cyanid-Komplex scheint axiale Symmetrie zu haben, wobei das Cyanid über das C-Atom an Kupfer gebunden ist (122).

Forman et al. (44) schließen aus der Photoinaktivierung des Apoproteins, daß diese drei N-Atome von Histidinresten des Erythrocupreins das aktive Zentrum bilden. Eine Abnahme des Histidingehalts nach der UV-Bestrahlung bei sonst unverändertem Aminosäuregehalt und eine dadurch fehlende Reaktivierung durch Cu^{2+} erhärten diese Vermutung. Das native Enzym wird durch die Bestrahlung nicht beeinflußt. Apo- und natives Protein wurden weiterhin mit diazotierter Sulfanilsäure, einem spezifischen Farbreagenz auf Histidin, behandelt. Dabei zeigt sich nur eine Reaktion mit dem Apoprotein. Kupfer und in einem geringeren Ausmaß Zink üben eine protektive Wirkung auf die Modifizierung aus und deuten auf eine Reaktion von 3,6 Histidinresten/Proteinuntereinheit (16 000 MG) hin. Stokes et al. (138) nehmen auf Grund von Protonenkernresonanzmessungen von nativem und Apoprotein an, daß sich Histidin an oder nahe an der Cu-Bindungsstelle im menschlichen und Rindererythrocuprein befindet. Die im metallfreien Protein auftretenden Signale werden Imidazol C-2 Resonanzen

zugeordnet und lassen auf ungefähr 6 Histidinreste/ Mol Protein schließen.

Zink ist im allgemeinen in Metallproteinen neben Cystein vor allem an Histidin gebunden, was aus präparativen Untersuchungen an Zink-Imidazolverbindungen und Zink-Histidinkomplexen hervorgeht (146).
Über die Zink-Bindungsstelle im Erythrocuprein ist jedoch auf Grund der fehlenden spektroskopischen und magnetischen Eigenschaften von Zn^{2+} noch sehr wenig bekannt.
An Hand von Röntgenphotoelektronenspektroskopie-Messungen wird aus den unterschiedlichen Signalintensitäten geschlossen, daß das Zink mehr im Innern des Proteins sitzt. Das Kupfer befindet sich in den Randzonen des Moleküls und ist auf diese Weise für das Lösungsmittel und das Substrat gut zugänglich (64, 65). Die extrem hohe Umsatzrate von $1,6 \pm 0,3 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$, die für die Reaktion mit $O_2^{\cdot-}$ bestimmt wurde (49, 123), steht damit in Einklang.

Die teilweise Substitution des Zink durch Kobalt deutet, wie bereits erwähnt, auf Metall-Metall-Wechselwirkungen hin, hervorgerufen durch eine enge räumliche Nachbarschaft von Cu^{2+} und Co^{2+} (16).
Dem Zink bzw. Kobalt wird bis jetzt in erster Linie eine strukturelle Funktion zugeschrieben, während Kupfer direkt am katalytischen Prozess beteiligt ist.

.4 Engeres Thema der Arbeit

Als zusätzliches Reinheitskriterium des mit spektroskopischen, chromatographischen und elektrophoretischen Methoden sowie durch das Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge charakterisierten Erythrocupreins war von Interesse, ob das Protein in kristallisierter Form erhalten werden kann.

Für weitere Untersuchungen mit Apoerythrocuprein war es zunächst notwendig, das homogene Apoprotein auf mögliche Kontaminationen mit dem Komplexbildner zu überprüfen, um sicherzugehen, daß dadurch die Rekonstitution mit den Metallionen Cu^{2+}, Zn^{2+} und Co^{2+} nicht gestört wird. Entsprechende Versuche wurden mit ^{14}C-EDTA durchgeführt.

Durch einfache Rekombinierungsversuche von Apoerythrocuprein mit Cu^{2+} und Zn^{2+} wurden nicht alle Eigenschaften des nativen Erythrocupreins wiedererlangt. Die ESR-Spektroskopie ist besonders geeignet, in dieser Hinsicht Abweichungen sichtbar zu machen. Es interessierte nun die Frage, ob das Apoprotein mit Cu^{2+} und Zn^{2+} in der Weise rekonstituiert werden kann, daß alle Kriterien, insbesondere die ESR-Daten, mit dem nativen Protein übereinstimmen oder ob die Rekonstitution nicht voll reversibel ist.

Der Einfluß der Metallionen auf das metallfreie Protein sollte im Hinblick auf das strukturelle und enzymatische Verhalten verschiedener Metall-Apoerythrocuprein-

komplexe, insbesondere der Singulett-Sauerstoff Dekontamination, untersucht werden.

Bislang ungeklärt war die Frage, ob Cu(I) in Apoprotein eingebaut werden kann oder ob eine sofortige Oxidation solch eines Cu(I)-Erythrocupreins eintritt.

Um Informationen über die Zink-Bindungsstelle zu bekommen, sollte eine Kobalt-Substitution am nativen Erythrocuprein vorgenommen werden und das Kupfer/Kobalt-Protein elektrophoretisch, lichtabsorptions-, CD- und ESR-spektroskopisch und auf enzymatische Aktivität untersucht werden. Calabrese, Rotilio und Mondovi (16) erreichten einen 60%igen Austausch von Zink gegen Kobalt durch Dialyse. Durch Gelfiltration sollte der Austausch ohne Beeinträchtigung der Proteinkomponente weiter gesteigert werden.

Mit der Röntgenphotoelektronenspektroskopie waren weitere Informationen über die Bindungsenergien der Metallionen und des Schwefels im Cu/Co-Erythrocuprein und verschiedenen Metallkomplexen des Apoerythrocupreins zu erhoffen.

Auf Grund der Vermutung, daß Histidin im aktiven Zentrum des Erythrocupreins sitzt und direkt an der Kupferbindung beteiligt ist (44, 138), sollte ein proteinähnlicher Modellkomplex aus Polyäthylenimin und Histidin synthetisiert werden. Es wurde vermutet, daß die Modellsubstanz mit Cu^{2+} die enzymatische Aktivität des Erythrocupreins besitzt, nachdem Cu^{2+}-Aminosäurekomplexe ebenfalls Aktivität aufweisen (61).

MATERIAL UND METHODEN

1 Chemikalien

Chemikalien wurden bezogen von der Firma:

Serva, Heidelberg: Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, Coomassie Brilliant-Blau, alle reinst, Ammoniumpersulfat p.a., Riboflavin.

Boehringer, Mannheim: Cytochrom c

Amersham-Buchler, Braunschweig: ^{14}C-EDTA

Packard Instruments, Frankfurt/M: 1,4-Bis-2-(Methyl-5-Oxazolyl)-Benzol (POPOP)

Koch-Light Laboratories, Colnbrook, England: 2,5-Diphenyloxazol (PPO)

Pharmacia, Uppsala, Schweden: Sephadex G 25, G 75

Whatman, Maidstone, England: DEAE 23 Cellulose

Amicon, NV, Oosterhout(NB), Holland: Membranfilter UM 2

Sartorius, Göttingen: Kollodiumhülsen

BOC-$N_{(im)}$-2,4-Dinitrophenyl-Histidin und Dicyclohexylcarbodiimid wurde von Doz. Dr. U. Weber, Physiol.-chem. Institut, Tübingen zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen und waren von p.a. Qualität.

Das für sämtliche Versuche verwendete Wasser war deionisiert und quarzdestilliert.

2.2 Geräte

Spektralphotometer PMQ II von Zeiss

Spektralphotometer DB-GT mit 10 inch Recorder von Beckman

Unicam SP 1800 UV Spectrometer mit AR 25 Linear Recorder von Philips

Flammenphotometer M4 Q III von Zeiss, ausgerüstet mit Linecomp-Schreiber und Hohlkathodenlampen (Cu,Zn,Co,Cd,Hg)

Dichrograph II,Model CD 185, Jouan-Roussel, Paris

ESR-Spektrometer, X-Band V-4502-II von Varian mit Tieftemperaturteil E-4557

Photoelektronenspektrometer V-IEE 15 von Varian

Packard Tricarb Scintillationszähler Modell 2002

Perkin Elmer 240 Elementar Analyser mit Speedomax-Schreiber von Leeds und Northrup

Polyacrylamid Gel Elektrophorese-Gerät von Desaga, Heidelberg mit Stromversorgungsgerät von Quickfit, Staffs, England

Knick pH-Meter von Colora, Lorch

pH-Meter 22 von Radiometer, Kopenhagen

Mistral Kühlzentrifuge von MSE

Tischzentrifuge Automatic-Superspeed, von Sorvall

Fraktionssammler mit Uvicord II und Schreiber von LKB Produkter, Stockholm

2.3 Isolierung von Rinder-Erythrocuprein

Erythrocuprein wurde aus Rindererythrozyten durch Fällung mit organischen Lösungsmitteln und Sephadex G 75- und DEAE 23-Säulenchromatographie isoliert (13, 23, 147). Es wurde darauf geachtet, daß nur Blut von jungen, kräftigen Stieren für die Präparation verwendet wurde, da bei diesen Tieren die Ausbeute an Erythrocuprein gegenüber Kühen deutlich erhöht war. Weiterhin war für eine optimale Ausbeute von Bedeutung, daß die Präparationsdauer möglichst kurz gehalten wurde und vier bis fünf Tage nicht überschritt. Das biologische Material wurde nicht länger als jeweils 20 bis 30 Min. der Behandlung mit den organischen Lösungsmitteln Äthanol und Chloroform sowie Aceton unterzogen, um möglichst schonende Bedingungen zu gewährleisten. Chloroform und Aceton wurden zuvor destilliert.

Da die Chromatographiesäulen nach längerer Benützung durch ein Verdichten des Gelmaterials in ihrer Durchflußgeschwindigkeit beeinträchtigt wurden, war jeweils nach zwei bis drei Proteinisolierungen eine Neufüllung notwendig. Hierfür wurde frisch aufbereitetes Sephadex G 75 bzw. DEAE 23 verwendet.

Die Aufbewahrung des isolierten Proteins in flüssigem Stickstoff (-196°C) erwies sich als äußerst vorteilhaft. Dies zeigte sich daran, daß selbst nach einem Zeitraum von 6 bis 12 Monaten die Superoxid-Dismutase-Aktivität und alle physikalisch-chemischen Eigenschaften unverändert blieben.

2.4 Kristallisierung von Erythrocuprein

Eine Lösung von Erythrocuprein in 10 mM KPP, pH 7,2 wurde in einem zylindrischen Kollodium-Membranfilter bei 0°C soweit eingeengt, bis eine leichte Trübung auftrat. Während der langsamen Erwärmung auf Raumtemperatur diffundierte der das Membranfilter umgebende Puffer in die nun gesättigte Proteinlösung zurück.

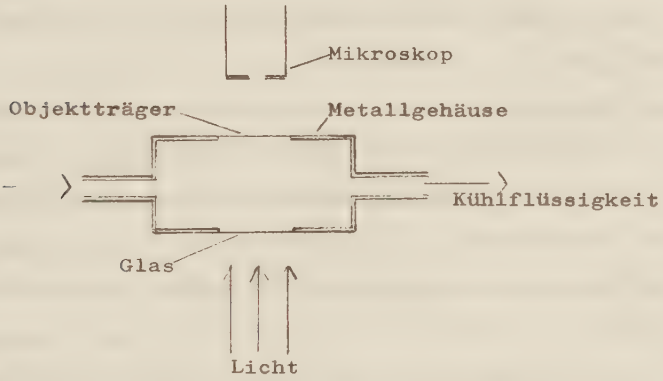
Dieser Vorgang wurde so lange fortgesetzt, bis der beim Einengen gebildete leichte Proteinniederschlag gerade wieder in Lösung ging. Nach dem Überführen der intensiv grünen Proteinlösung in ein Reagenzglas und 3 - 4-tägigem Stehenlassen bei 4°C trat Kristallisation ein.

Ein weiterer Kristallisierungsversuch wurde mit 2-Methylpentandiol(2,4) (MPD), einem gebräuchlichen Kristallisierungsreagenz, vorgenommen (27).

Hierfür wurden 500 µl einer Erythrocupreinlösung in 10 mM KPP, pH 7,2 (OD_{259} 0,7 = 2,2 mg Protein/ml) mit 750 µl MPD versetzt. Dieses Mischungsverhältnis entspricht einer MPD-Konzentration von 60% v/v. Zur Kristallisation wurde der Ansatz 4 bis 5 Wochen bei 22°C aufbewahrt.

Die photographischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-Mikroskop mit aufgesetzter Kleinbildkamera und Kühlobjektträger bei 1 - 2°C gemacht. Als Film wurde ein

Kodak Ektachrome Diapositiv Kunstlichtfilm verwendet. Die Skizze zeigt einen gekühlten Objektträger (Kühltisch) durch den Kühlflüssigkeit mit einer Pumpe im Kühlthermostaten befördert wurde.



2.5 Präparation von Apoerythrocuprein

Die Präparation von Apoerythrocuprein wurde im wesentlichen nach der säulenchromatographischen Methode (55, 149, 151) durchgeführt.

Eine Sephadex G 25-Säule (16 x 1400 mm) wurde mit 10 mM EDTA (Di-Natriumsalz), das mit Eisessig auf pH 3,8 gebracht wurde, äquilibriert. Sodann wurden 1 - 2 ml Erythrocuprein auf die Säule aufgetragen und innerhalb von 10 h bei Raumtemperatur eluiert. Als Elutionsmittel diente 10 mM EDTA mit Essigsäure, pH 3,8.

Das eingeengte und auf Sephadex G 25 in 10 mM KPP, pH 7,2 überführte Apoprotein wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6 Prüfung des Apoerythrocupreins auf gebundenes EDTA

Unter bestimmten Bedingungen ist es möglich, daß EDTA mit den Serinresten von Proteinen stabile Bindungen eingeht und dadurch gewisse strukturelle Veränderungen verursacht. Dies könnte bei Rekonstitutionsversuchen eines Apoproteins mit Metallionen die Ergebnisse verfälschen.

Um nun zu untersuchen, ob das metallfreie Protein durch evtl. gebundenes EDTA während der Präparation verunreinigt ist, wurde Erythrocuprein durch Gelfiltration in Apoerythrocuprein überführt (55, 149). Dem Säulenpuffer wurde zu diesem Zweck ^{14}C-EDTA (Di-Natriumsalz) zugesetzt (5 µCi/l). Das bei dieser Präparation gewonnene Apoprotein wurde in 10 mM KPP, pH 7,2 umgesalzt und im Packard Tricarb Scintillationszähler Model 2002 auf die Restradioaktivität untersucht. Der ^{14}C-EDTA-Säulenpuffer diente als Vergleich.

Der Meßansatz bestand aus:

100 µl Proteinlösung
100 µl H_2O
5 ml Äthanol
10 ml Toluolscintillator (5,0 g PPO, 0,1 g POPOP ad 1000 ml Toluol)

Der Vergleich enthielt statt Proteinlösung und H_2O 200 µl Säulenpuffer.

2.7 Rekonstitutionsversuche von Apoerythrocuprein mit Metallionen

2Cu/2Zn-Apoerythrocuprein

Die einfache Zugabe von stöchiometrischen Mengen Cu^{2+} und Zn^{2+} zu Apoerythrocuprein bewirkt zwar eine weitgehende Nativität des rekonstituierten Proteins, zeigt aber im ESR-Spektrum noch entscheidende Abweichungen der $A_{\parallel}$-Werte (151). Diese werden auf eine unspezifische Bindung von Cu^{2+} am Protein zurückgeführt. So wurde die ESR-Spektroskopie als Kriterium für die Nativität herangezogen.

Für die Rekombinierung wurden verschiedene Methoden angewendet:

a) 10 mg Apoerythrocuprein, gelöst in 10 ml 5 mM KPP, pH 7,2 wurden mit 50 µg Cu^{2+} (8 µl 0,1 M $CuSO_4$-Lösung) und ebensoviel Zn^{2+} (8 µl 0,1 M $ZnCl_2$-Lösung) versetzt. Das entspricht einem Metallionenüberschuß von ca. 20%. Nach einer Stunde Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde die Proteinlösung auf eine DEAE 23-Säule (10 x 80 mm) aufgetragen, mit 5 mM Puffer nachgewaschen und mit einem Gradienten von 5 - 100 mM KPP eluiert.

b) Eine Apoerythrocupreinprobe (10 mg in 1 ml) wurde wie in a) mit Cu^{2+}u.Zn^{2+} inkubiert und ca. 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Inkubationslösung über eine Sephadex G 25-Säule (14 x 250 mm) von evtl. unspezifisch gebundenen Metallionen befreit. Das Gel wurde zuvor mit 10 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 6,0 und 1 mM EDTA äquili-

briert. Die Elution erfolgte bei 4°C mit demselben Puffer. Das EDTA-freie Protein-Eluat wurde in einem weiteren Schritt auf eine DEAE 23-Säule aufgetragen und die Trennung wie in a) durchgeführt.

c) In einen zylindrischen Kollodium-Membranfilter wurden 1,5 ml Apoerythrocuprein (10 mg/ml) in 5 mM KPP, pH 7,2 gegeben. Die umgebende Lösung, 100 ml H_2O bidest., enthielt 40 µl 0,1 M $CuSO_4$, 40 µl 0,1 M $ZnCl_2$ und hatte einen pH-Wert von 4,9. Die Dialysedauer betrug 12 Stunden bei Raumtemperatur.

Infolge des höheren osmotischen Drucks der Proteinlösung kam es im Inneren des Membranfilters zu einer Verdünnung auf ca. 4 ml. Deshalb wurde mit der Wasserstrahlpumpe wieder eingeengt und zweimal mit 5 mM KPP gewaschen, um freie Cu^{2+} und Zn^{2+}-Ionen zu entfernen. Danach wurde die Proteinlösung auf eine DEAE 23-Säule aufgetragen und wie oben verfahren.

Co-Apoerythrocuprein

In gleicher Weise wurde Apoerythrocuprein mit Co^{2+} behandelt. Die Dialyselösung enthielt hier 40 µl 0,1 M $CoCl_2$-Lösung und wurde mit Eisessig auf pH 4,7 eingestellt.

In einem weiteren Versuch wurden Zn^{2+} und Co^{2+} zusammen angeboten (je 40 µl 0,1 M $ZnCl_2$- und $CoCl_2$-Lösung auf 100 ml H_2O). Der pH-Wert nach Ansäuern mit Essigsäure betrug 4,8.

Sämtliche behandelten Apoproteine wurden atomabsorptions-, UV-, visuell-, ESR- und CD-spektroskopisch untersucht sowie die Homogenität zusätzlich mit Hilfe der Disk-Elektrophorese überprüft und die enzymatische Aktivität gemessen.

2.8 Darstellung von Cu(I)-Apoerythrocuprein

Es wurde versucht, Cu(I)-Apoerythrocuprein herzustellen und näher zu charakterisieren. Eine Methode, Apoproteine von Kupferproteinen mit Metallionen zu rekombinieren, besteht im Einbau von Cu(I) (85, 86), das als Cu(I)-Acetonitril-Komplex in wässriger Lösung mit mindestens 50% (v/v) Acetonitril stabil ist. Diese Verbindung wurde nach (58) hergestellt.

Hierfür wurde Acetonitril, das 2N an $HClO_4$ war, mit Cu_2O versetzt und 1 Stunde lang am Rückfluß gekocht. Beim Abkühlen fiel ein weißer kristalliner Niederschlag von $Cu(CH_3CN)_4ClO_4$ aus. Die Kristalle wurden zweimal mit Acetonitril unter N_2-Atmosphäre gewaschen.

2.9 Präparation von Kobalt-Erythrocuprein

Zum Austausch des Zinks im Erythrocuprein gegen Kobalt wurde natives Protein auf eine Sephadex G 25-Säule, äquilibriert mit 100 mM Natrium-Acetat Puffer pH 5,4, aufgetragen. Der obere Teil des Gels enthielt 20 ml 500 mM $CoCl_2$, das mit Essigsäure auf pH 4,3 eingestellt wurde (Säulenmaße: 15 x 600 mm).

Die Elution erfolgte mit 100 mM Na-Ac Puffer pH 5,4 bei Raumtemperatur. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde so geregelt, daß die Proteinbande 11 - 12 Stunden in der Co^{2+}-Zone verweilte. Anschließend wurde das Cohaltige Erythrocuprein innerhalb 1 Stunde weiter eluiert und mit einem LKB-Fraktionssammler aufgefangen. Im gleicher Weise wurde ein Austausch des Zinks gegen Cadmium und Quecksilber versucht.

2.10 Konzentrierungsverfahren

Nach der Isolierung des Erythrocupreins, der Präparation des Apoproteins und des Kobalt-Erythrocupreins und in anderen Fällen, wurde es notwendig, Proteinlösungen zu konzentrieren. Dafür wurden die verdünnten Lösungen auf eine DEAE 23-Säule aufgetragen, nachdem das Gel zuvor auf eine niedrige Ionenstärke gebracht wurde, und mit erhöhter Ionenstärke eluiert. Die Säulenmaße betrugen für 10 - 20 mg Protein ca. 20 x 100 mm. Weiterhin wurden Proteinlösungen isoionisch mit Hilfe einer Überdruck-Membranfiltration (Amicon Diaflow Apparatur mit UM 2 Membran, Ø 62 mm) oder Sartorius Kollodiumhülsen mit Wasserstrahlvakuum eingeengt.

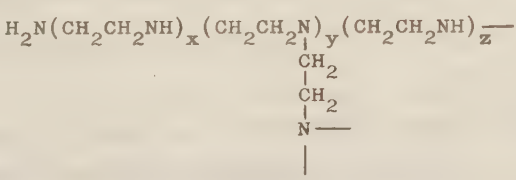
1 Synthese von Kobalt-Aminosäure-Komplexen (62)

Als Vergleichssubstanzen für die XPS-Messungen des Kobalt-Erythrocupreins und des Kobalt-Apoerythrocupreins wurden die Kobalt-Komplexe der Aminosäuren Histidin, Tyrosin und Tryptophan hergestellt. Hierfür wurden jeweils 100 mg Aminosäure in 50 - 100 ml H_2O gelöst, mit 200 mg basischem Co(II)OH CO_3 versetzt und 10 Min. gekocht. Anschließend wurde heiß filtriert und die Komplexe mit Äthanol ausgefällt.

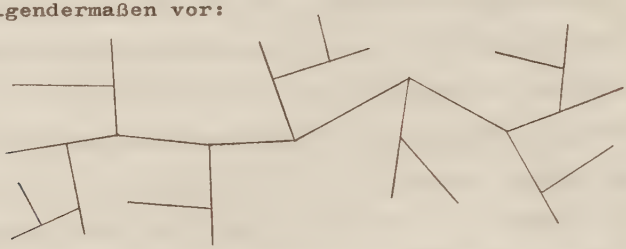
2 Synthese von Polyäthylenimin-Histidin als Modellkomplex für Erythrocuprein

2.1 Kupplungsreaktionen

Die Synthese wurde nach Art einer Peptidverknüpfung der primären Aminogruppen des Polyäthylenimins mit der Carboxylgruppe des geschützten Histidins vorgenommen. Etwa 9 Gewichtsprozente des Polyäthylenimins sind primäre Aminogruppen, wobei diese 25% aller Aminogruppen darstellen (50% sekundäre, 25% tertiäre Aminogruppen) (72, 74). Ein Ausschnitt des Polymeren ist nachstehend dargestellt.



Die Verzweigung des Moleküls liegt dabei nach Klotz (74) folgendermaßen vor:



Für die Kupplungsreaktion wurde eine 50%ige Lösung von Polyäthylenimin in H_2O und tert.-Butyloxycarbonyl-$N_{(im)}$-2,4 Dinitrophenyl-Histidin (BOC-DNP-His) verwendet. Da die Reaktion nicht in wässrigem Medium abläuft, wurde das Polyäthylenimin in Methylenchlorid, das zuvor über wasserfreiem Natriumcarbonat destilliert wurde, überführt. Hierzu ließ man die Substanz dreimal mit absolutem Äthanol bei 30°C am Rotationsverdampfer einengen. Danach wurde in destilliertem Methylenchlorid aufgenommen. Um letzte Spuren Wasser und Äthanol zu entfernen, wurde der Lösung Molekularsieb (3 Å) zugesetzt, und das Gefäß mit einem Calciumchlorid-Trockenrohr versehen.

Als Kupplungskomponente wurde N,N'-Carbonyldiimidazol verwendet (135). Bei diesem Reagenz entsteht während der Reaktion neben Imidazol nur CO_2, das aus der Lösung entweicht.

Der Reaktionsansatz enthielt:

2,7 g (15 mM primäre Aminogruppen) Polyäthylenimin in 40 ml CH_2Cl_2 mit 1,0 g N,N'-Carbonyldiimidazol

100 mg = 0,237 mM BOC-DNP-His in 5 ml CH_2Cl_2 (langsam unter Rühren zugegeben)

Es trat sofort eine intensive Gelborange-Färbung auf, die von den Nitrophenyl-Resten herrührt. Diese Farbe ist in einer Lösung des Histidinderivates in CH_2Cl_2 mit der Kupplungskomponente nicht zu beobachten. Beim vollständigen Einengen am Rotationsverdampfer bei 30°C bildete sich ein rotbrauner harziger Rückstand, der nicht mehr in Lösung ging. Deshalb wurde das Reaktionsgemisch nur bis auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Volumens durch Entzug von CH_2Cl_2 konzentriert und in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2 überführt. Dabei ging das gefärbte Copolymerisat spontan in die obere, wässrige Phase über. Das Methylenchlorid, das die untere Phase bildete, entfärbte sich und wurde mit Hilfe eines Scheidetrichters abgetrennt.

Zusätzlich wurde noch eine Synthese mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz durchgeführt. Das Polyäthylenimin wurde wie oben vorbehandelt.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

2,15 g Polyäthylenimin in 40 ml CH_2Cl_2 mit 100 mg = 0,237 mM BOC-DNP-His

1 ml 2 N = 2 mM DCC (tropfenweise unter Rühren bei 0°C zugegeben)

Die zuvor schwache gelbe Lösung schlug auch hier gleich nach Zugabe der Kupplungskomponente in ein intensives Gelborange um. Nach ca. 2 Stunden wurde die Reaktionsmischung in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2 überführt.

2.12.2 Abspaltung der Nitrophenylreste von Polyäthylenimin-DNP-His

Eine elegante Methode, Nitrophenylgruppen abzuspalten, besteht in der Thiolyse mit Mercaptoäthanol oder Thiophenol bei pH 7 - 8. Der Verlauf der Reaktion kann photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 350 nm verfolgt werden (130). Ein Blindversuch wurde mit BOC-$N_{(im)}$-2,4-Dinitrophenyl-Histidin und Mercaptoäthanol durchgeführt. Der Abspaltungsversuch mit dem Copolymeren wurde in einer Amicon Ultrafiltrationszelle mit UM 2 Membran vorgenommen. Hierbei sollte das freie Nitrophenol die Membran passieren, während das hochmolekulare Polyäthylenimin-Histidin zurückgehalten wird.
Ein weiterer Abspaltungsversuch der Nitrophenylreste wurde mit Hydrazinhydrat durchgeführt.

2.12.3 Abspaltung der BOC-Schutzgruppe (95, 129)

12 ml des Copolymeren wurden mit 2 ml HCl konz. langsam, tropfenweise und unter Rühren zur Abspaltung der Amino-Schutzgruppe versetzt, was einer HCl-Endkonzentration von 2 N entspricht. Nach 30 Min. erfolgte Neutralisation mit NaOH.

2.13 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von verschiedenen Metallkomplexen des Apoerythrocupreins

Zur Prüfung partiell und voll rekonstituierter Cupreine auf enzymatische Aktivität wurde neben dem Cytochrom c-

Reduktasetest nach Weser und Voelcker (145, 152) die Singulett-Sauerstoff dekontaminierende Aktivität dieser Proteine nach Paschen und Weser (108) herangezogen. Bei diesem Test wird CrO_8^{3-} als Substrat angeboten, wobei während der Reaktion

$$4\ CrO_8^{3-} + 2\ H_2O = 4\ CrO_4^{2-} + 7\ O_2 + 4\ OH^-$$

hochenergetischer $^1\Delta_g O_2$ entsteht, der mit Cuprein reagiert.

Gemessen wurde die Hemmung der Luminol-Chemilumineszenz durch das Enzym im Scintillationszähler. Hierbei bewirkt der nicht vom Enzym abgefangene Singulett-Sauerstoff eine Lichtreaktion mit Luminol.

Der Meßansatz enthielt:

2 ml HEPES-Puffer 0,1 M pH 7,8
500 µl HEPES-Puffer 0,1 M pH 7,8 + 10^{-3} M Luminol
100 µl Protein in HEPES-Puffer
50 µl K_3CrO_8, 3,4 x 10^{-3} M in 0,1 N NaOH

Das Gesamtvolumen betrug 2,65 ml. Gestartet wurde mit obiger K_3CrO_8-Lösung (50 µl), wobei die Endkonzentration an K_3CrO_8 6,5 x 10^{-5} M war. Die Meßdauer betrug 1 Minute. Der Leerwert enthielt im Meßansatz statt 100 µl Proteinlösung 100 µl H_2O.

4 Proteinanalyse

Zur Proteinbestimmung wurde für das reine Erythrocuprein ein molarer Extinktionskoeffizient von 9840, für das Apoprotein von 3670 jeweils bei 259 nm zugrunde gelegt (147, 151).

In anderen Fällen wurde die Mikrobiuret-Methode herangezogen, die speziell die Anzahl der Peptidbindungen im Protein erfaßt (4). Durch den niedrigen Gehalt an Tyrosin und das Fehlen von Tryptophan im Erythrocuprein ist die Lowry-Methode hier ungeeignet.
Durchführung der Mikrobiuret-Bestimmung:
Zu 100 µl der Proteinlösung (0,1 - 2,5 mg Protein) werden 1 ml 3% NaOH und 50 µl Biuret-Reagenz gegeben. Nach 15 Min. wird die Extinktion bei 330 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin als Standard aufgestellt. Zur Absorptionsmessung wurde ein Zeiss PMQ II Spektralphotometer und für die Aufnahme von Spektren im sichtbaren und UV-Bereich ein Unicam SP 1800 Photometer von Philips verwendet.

2.15 Metallanalyse (33)

Kupfer, Zink und Kobalt wurde mit Hilfe eines Atomabsorptionsspektrophotometers Zeiss M4Q III in Verbindung mit einem PMQ II und einem Linecomp Recorder gemessen. Acetylen diente als Brenngas.
Für die Bestimmungen wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration bis zu 3 mg/ml verwendet. Die Meßergebnisse höher konzentrierter Lösungen waren nicht reproduzierbar, da die höhere Viskosität zu einer verzögerten Ansaugung durch das Gerät führt. Andererseits verursachen Proteinbestandteile während der Verbrennung in der Flamme neben der Absorption

durch das verdampfte Metall eine zusätzliche Intensitätsminderung des emittierten Hohlkathodenstrahls, wodurch das Meßergebnis unbrauchbar wird.

16 Analytische Polyacrylamid Disk-Elektrophorese

Zur Prüfung der verschiedenen rekonstituierten Erythrocupreine und des Kobalt-Erythrocupreins auf ihr Verhalten im elektrischen Feld wurden Disk-Elektrophoreseläufe durchgeführt. Hierfür stand eine Elektrodenkammer von Desaga, Heidelberg, mit einem Stromversorgungsgerät von Quickfit, Staffs (England), zur Verfügung.
Es wurde das Gelsystem Nr. 1a (7% - pH 8,9) nach Maurer (94) und Tris/Glycin-Puffer pH 8,3 als Elektrodenpuffer verwendet. Die Laufzeit betrug 2,5 Stunden bei 250 V und 60 mA.
Zur Anfärbung der Proben wurde das Gel zunächst zur Fixierung der Proteine 18 Stunden mit 20%iger Sulfosalicylsäure und anschließend 2 - 3 Stunden mit 0,02%iger Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung behandelt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit 7%iger Essigsäure ausgewaschen.

17 Polyacrylamid-Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat

Für Stabilitätsuntersuchungen von partiell und vollständig rekonstituiertem Apoerythrocuprein mit Kupfer und Zink wurde die Polyacrylamid-Elektrophoresemethode nach Dunker und Rueckert(32) herangezogen. Bei diesem Verfahren wandern die Moleküle ausschließlich nach ihrer

Größe, was bedeutet, daß im Falle des Zerfalls eines Proteinmoleküls die auftretenden Bruchstücke im elektrischen Feld unterschiedlich weit wandern.

Das verwendete Gel setzte sich zusammen aus:

10% Acrylamid mit Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30 : 1 (w/w) gemischt

0,1 % Natriumdodecylsulfat

0,1 % N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (v/v) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,05 Volumenteilen einer 1%igen Ammoniumpersulfatlösung. Als Elektrodenpuffer diente 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, wobei die obere Elektrodenkammer zusätzlich 0,1 % Natriumdodecylsulfat enthielt.

Die Elektrophoresedauer betrug 2 Stunden bei 80 V und 200 mA. Die Fixierung und die Anfärbung erfolgte wie in 2.16.

Als Vergleichssubstanzen dienten Cytochrom c, Katalase, Ovalbumin.

2.18 Circulardichroismus-Messungen (CD)

Die chiroptischen Eigenschaften des Kobalt-Erythrocupreins und verschiedener Metallkomplexe des Apoerythrocupreins wurden im Vergleich zum 2Cu/2Zn-Protein durch CD-Messungen geprüft. Die Messungen erfolgten mit einem Jouan-Roussel Dichrograph II, Model CD 185, Paris. Die Proben wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 und in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1,0-10,0 mm

gemessen. Während der Messung wurde die Temperatur (20°C) konstant gehalten. Die CD-Spektren umfassten einen Bereich von 610 - 210 nm. Die molare Ellipti-zität erhält man nach

$$[\theta] = 3300 \cdot E = \frac{3300 \cdot MG \cdot 10^{-5}}{c \cdot s} \cdot a \left[\frac{Grad \cdot cm^2}{Decimol}\right]$$

Dabei bedeuten: MG: Molekulargewicht (unterhalb 250 nm sind die Elliptizitäten auf das mittlere MG der Aminosäuren bezogen, das mit 110 angegeben wird.)

c: Konzentration in mg/ml

s: Schichtdicke der Küvette in cm

a: Differenz des Schreiberausschlages zwischen Nullinie und Protein-messung in mm

19 Elektronenspinresonanz-Messungen (ESR)

Mit auf unterschiedliche Weise rekonstituiertem Erythro-cuprein, Kobalt-Erythrocuprein, Kobalt-Apoerythrocuprein und verschiedenen Kobalt-Aminosäure-Komplexen wurden ESR-Messungen durchgeführt. Die Spektren wurden mit einem Varian-ESR-Spektrometer, X-Band V-4502-II bei -160°C auf-genommen. Es wurden Quarz-Rundküvetten mit einem Durch-messer von etwa 3 mm verwendet, die 300 µl Probenlösung enthielten.

20 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Das XPS-Verfahren wird verwendet, um über die Bindungs-verhältnisse, d.h. über die Oxidationsstufen von Ligan-den und Metallionen in Metallenzymen Aufschluß zu er-halten. Die Methode kann Hinweise auf die unmittelbar

benachbarte chemische Umgebung der Metallionen im Protein liefern, insbesondere, wenn es sich um Metalle handelt, die nicht mit ESR- oder Mössbauer-Spektroskopie untersucht werden können. Die Photoelektronenspektroskopie erlaubt die Bestimmung der Bindungsenergien von Elektronen, indem man die kinetische Energie der durch Photonen mit definierter Wellenlänge emittierten Photoelektronen mißt ($E_{kin} = hv - E_B$) (14, 15, 76, 132). Ändert man die Energie der anregenden Strahlung, so können die relativ locker gebundenen Elektronen der Molekülorbitale bzw. der äußersten Atomniveaus oder die fester gebundenen Elektronen aus den weiter innen gelegenen Niveaus der Atome emittiert werden.

Wichtige Informationen erhält man durch chemische Verschiebungen der Bindungsenergien, die durch Veränderungen der chemischen Umgebung des Atoms herrühren. Damit verändert sich seine Ladung und somit das elektrische Potential mit gleichzeitiger Verschiebung der Bindungsenergie auch innerer Atomelektronen. Die im Photoelektronenspektrum sichtbar werdende chemische Verschiebung ist eine Funktion der relativen Elektronenaffinitäten der Nachbaratome. Dadurch ist es z.B. möglich, Wertigkeitsstufen, Ladungsveränderungen und die chemische Umgebung eines Atoms zu bestimmen.

Die XPS-Messungen wurden mit einem V-IEE-15 Spektrometer der Firma Varian, Darmstadt, durchgeführt. Die Röntgenstrahlung (Mg-K$\alpha_{1,2}$) hatte eine Energie von

1253,6 eV. Das Meßvakuum betrug 10^{-6} Torr. Die kristallinen bzw. lyophilisierten Proben wurden auf einem Tesafilmstreifen, der den Probenhalter umgab, befestigt. Die Proteinproben wurden vor dem Gefriertrocknen über eine Sephadex G 25-Säule entsalzt. Das 1s Signal des aus dem Klebeband stammenden Kohlenstoffs (284,0 eV) diente als Referenz.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kristallisierung von Rinder-Erythrocuprein

Aus Rindererythrozyten konnte durch Fällung mit organischen Lösungsmitteln und säulenchromatographischen Methoden (Sephadex G 75 und DEAE 23 Cellulose) ein Protein isoliert werden, das auf Grund physikalisch-chemischer Untersuchungen wie Spektroskopie im sichtbaren und UV-Bereich, ESR- und CD-Spektroskopie, Disk-Elektrophorese, Metallgehalt und Messung der enzymatischen Aktivität als Erythrocuprein hoher Reinheit bezeichnet werden kann. In Abb. 1 ist z.B. das charakteristische UV-Spektrum des Proteins und des daraus durch Entfernen der Metallionen erhaltenen Apoerythrocupreins dargestellt.

a) Kristallisierung aus einer konzentrierten Proteinlösung (100 mg/300 µl):

Aus einer bei $0^{\circ}C$ durch Membranfiltration gesättigten Erythrocuprein-Lösung bildeten sich nach 3 bis 4-tägigem Stehenlassen im Kühlschrank ($4^{\circ}C$) grünblaue Kristalle verschiedener Größe aus. Die größten unter ihnen wiesen eine Kantenlänge von $0{,}35 \pm 0{,}10$ mm auf. Es stellte sich heraus, daß sie äußerst wärmeempfindlich waren, d.h. ein wenige Sekunden langes Erwärmen auf Raumtemperatur bewirkten starke Anlösungsprozesse an den Kanten, bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle.

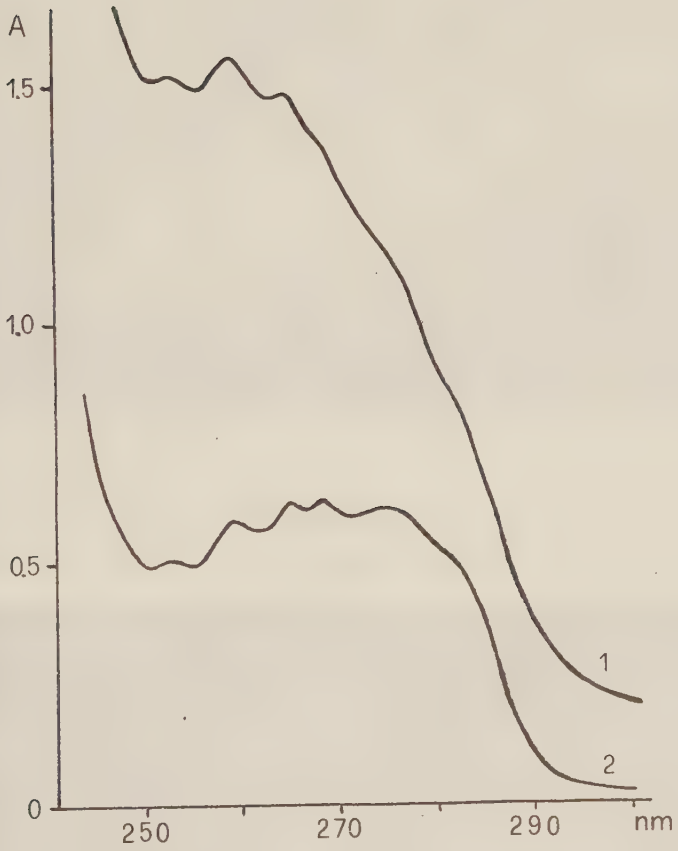


Abb.1: UV-Spektren von Rinder-Erythrocuprein (1) und dem Apoprotein (2). Die Proteinkonzentration beträgt jeweils 5,2 mg/ml in Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2. Die Messung erfolgte in 1 cm Quarzküvetten gegen Phosphat-Puffer.

Beim Photographieren unter diesen Bedingungen konnten deshalb nur angelöste Kristalle aufgenommen werden, was nicht den erwünschten Erfolg brachte.

Aus diesem Grund wurden Aufnahmen angefertigt, bei denen die Kristalle in der Mutterlauge auf einen gekühlten Objektträger (Kühltisch) gebracht wurden. Mit dieser Vorrichtung gelang es, Farbphotos von Erythrocuprein-Kristallen aufzunehmen (Abb.2). Die Kristallform ist orthorhombisch. Die Kantenlänge des Kristalls in Abb.2a beträgt 0,34 mm. Der Vergrößerungsmaßstab bei beiden Aufnahmen ist gleich (360-fach).

b) Kristallisierung aus Erythrocuprein-Lösungen mit niedriger Proteinkonzentration:

Bei dieser Methode, bei der 2-Methylpentandiol (2,4) herangezogen wurde (60% v/v), dauerte es wesentlich länger, bis Kristallisation eintrat. Nach 4 bis 5 Wochen bildeten sich bei 20 bis 24°C nadelförmige, zu Büscheln zusammengelagerte Kristalle an der Reagenzglaswand, die zwar temperaturbeständig waren, aber sehr leicht zerbrachen. Eine Kristallform konnte nicht zugeordnet werden, sie deutet jedoch auf eine monokline Struktur hin. Ein Photo dieser blassgrünen Kristalle zeigt Abb.3. Die Länge der Nadeln beträgt 0,4 - 0,5 mm. Bei einer geringeren MPD-Konzentration war keine Kristallisation zu beobachten, höhere Konzentrationen

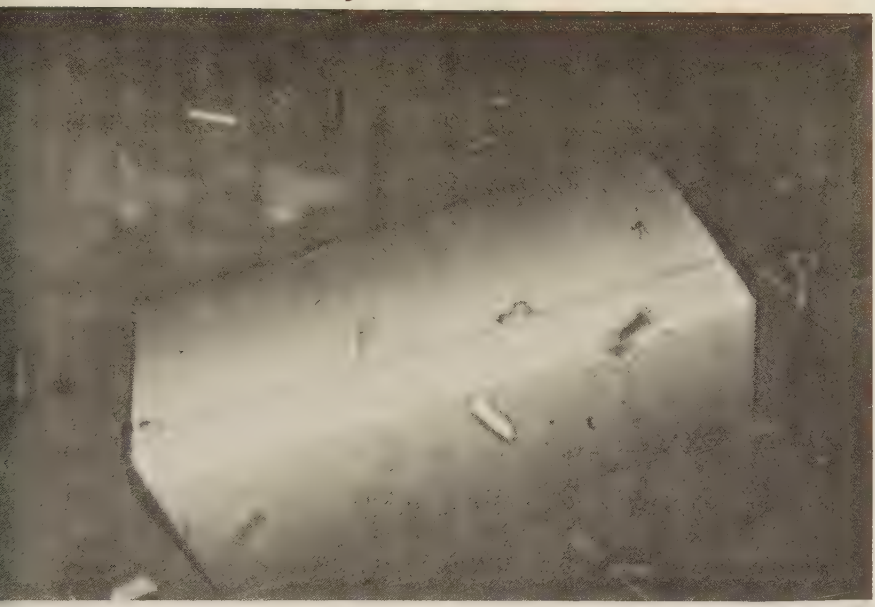


Abb.2a): Mikroskopische Kristallaufnahme von Rinder-Erythrocuprein. Vergrößerung: 240-fach. Kristallisation aus einer gesättigten Proteinlösung (ca. 300 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2) bei $4^{\circ}C$. Kristallisationsdauer: 3 - 4 Tage. Film: Kodak Ektachrome Diapositiv Film.

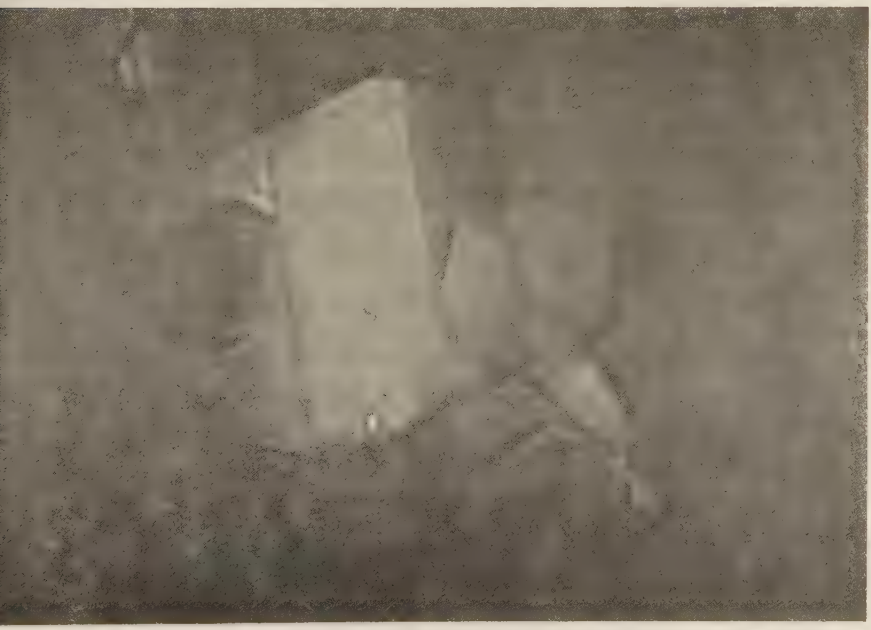


Abb.2b): Bedingungen wie in Abb.2a).

Abb.3: Mikroskopische Kristallaufnahme von Rinder-Erythrocuprein. Vergrößerung: 65-fach. Kristallisation mit 60% v/v 2-Methylpentandiol (2,4) bei 22°C.
Proteinkonzentration 2,2 mg/ml
Kristallisationsdauer 4 - 5 Wochen
Film: Kodak Ektachrome Diapositiv Film

führten zu einem amorphen Niederschlag. Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1,0 - 2,5 mg/ml in 10 mM KPP, pH 7,2 führten alle zu den gleichen Ergebnissen.

2 Prüfung des Apoerythrocupreins auf gebundenes EDTA

Das mit EDTA als Komplexbildner bei pH 3,8 über eine Sephadex G 25-Säule gewonnene Apoprotein hatte einen Restmetallgehalt von weniger als 1% (UV-Spektrum Abb.1), wie mit dem zur Verfügung stehenden Atomabsorptionsspektrometer festgestellt werden konnte.

Um sicher zu gehen, ob EDTA in irgendeiner Form gebunden, z.B. mit der OH-Gruppe von Serinresten des Proteins partiell verestert ist, wurde bei einer Apoerythrocuprein Präparation dem Säulenpuffer radioaktives EDTA (~5 µCi/l ^{14}C-EDTA) zugegeben.

Nach dem Einengen und dreimaligem Waschen des Eluats im Kollodium-Membranfilter wurde die Restradioaktivität des ^{14}C-EDTA gegen den Säulenpuffervorlauf gemessen.

200 µl	^{14}C-EDTA Puffer	2700 cpm
200 µl	Proteinlösung	720 cpm (Gesamtradioaktivität 4040 cpm)

Nachdem das Protein über eine G 25-Säule gereinigt wurde, zeigte die folgende Messung weit bessere Werte.

200 µl	^{14}C-EDTA Puffer	2230 cpm
200 µl	Proteinlösung	13 cpm (Gesamtradioaktivität 450 cpm)

Die Gesamtmenge an Apoprotein, die zu Anfang in 18 ml

Säulenpuffer eluiert wurde, betrug 28 mg = $8,4 \times 10^{-7}$ Mol. Das entspricht der aufgetragenen Proteinmenge. Die gemessenen 2230 cpm entsprechen 200 µl der verwendeten 10^{-2} M EDTA-Pufferlösung = 2×10^{-6} Mol EDTA. 450 cpm der Gesamtproteinmenge ($8,4 \times 10^{-7}$ Mol) sind dann $4,0 \times 10^{-7}$ Mol EDTA, d.h. auf die 300 Aminosäurereste des Apoerythrocupreins kommen weniger als 0,5 Mol EDTA. Diese EDTA-Konzentration fällt daher nicht ins Gewicht und kann vernachlässigt werden.

3.3 Rekonstitutionsversuche von Apoerythrocuprein

3.3.1 Einbau von Cu^{2+} und Zn^{2+}

Als Kriterium für die Vollständigkeit der Rekonstitution von Apoerythrocuprein mit Cu^{2+} und Zn^{2+} wurden die Spektren im sichtbaren und UV-Bereich, die CD-Spektren und insbesondere ESR-Messungen herangezogen. Außerdem wurden Homogenitätstests, Disk-Elektrophoresen, Messungen der Superoxid-Dismutase Aktivität, sowie Bestimmungen des Protein- und Metallgehalts durchgeführt. Die ESR-Spektroskopie war jedoch die einzig verlässliche Methode, die mit größter Wahrscheinlichkeit Rückschlüsse erlaubte, inwieweit das Cu^{2+} nach erfolgter Rekonstitution die gleiche Bindungsstelle wie im nativen Erythrocuprein einnimmt.

Für die Versuche wurde EDTA-freies Apoprotein verwendet. ESR-Messungen wurden jeweils ca. 24 Stunden nach der Inkubation mit Metallionen durchgeführt.

Das mit einem ca. 20%igen Überschuß an Cu^{2+} und Zn^{2+} inkubierte und über DEAE 23 gereinigte Apoprotein stimmte in allen physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften mit denen des nativen Proteins mit Ausnahme des ESR-Spektrums überein. Hier zeigten sich deutliche Veränderungen in den $A_{\parallel}$-Werten, die sich von 132 $\pm$ 2 G beim nativen Erythrocuprein auf 143 $\pm$ 2 G verbreiterten. Diese Werte ergaben sich auch nach einfacher Zugabe der Metallionen in stöchiometrischen Mengen zu Apoprotein (Abb.4 Spektrum 1). Die übrigen Daten, wie $g_{\parallel}$ = 2,258, g_{max} = 2,037 und g_{m} = 2,080 waren identisch mit denen des nativen Proteins.
Die weiteren analytischen Daten zu obiger Präparation waren:
Proteinkonzentration: 0,375 mM, Cu: 0,93 mM, Zn: 0,71 mM
Es ist auffallend, daß der Cu-Gehalt auf 2,44 g Atome/Mol Protein erhöht ist, was bedeutet, daß überschüssiges Cu^{2+} am Protein gebunden ist. Wurde zu Apoprotein einfach Cu^{2+} im Überschuß zugegeben (4 gAtome/Mol Protein), so zeigten sich ebenfalls Verschiebungen von $A_{\parallel}$ nach höheren Werten (145 $\pm$ 2 G). Erstaunlicherweise konnte zusätzlich zu nativem Erythrocuprein gegebenes Cu^{2+} (2 gAtome/Mol Protein) kaum von "nativem Cu" unterschieden werden. Bis auf die Bandbreite $A_{\parallel}$ (137 $\pm$ 2 G) waren die ESR-Daten genau die gleichen wie im nativen Protein.

Die rekonstituierten Apoprotein-Proben

a) Inkubation mit Cu^{2+} und Zn^{2+}, Reinigung über G 25 mit 1 mM EDTA, pH 6,0 und anschließender DEAE 23-Behandlung und

b) Dialyse gegen Cu^{2+} und Zn^{2+} bei pH 4,9 und DEAE 23-Reinigung

zeigten neben allen physikalisch-chemischen Eigenschaften und im enzymatischen Verhalten auch im ESR-Spektrum volle Übereinstimmung mit dem nativen Erythrocuprein (Abb.4). Die einzelnen Proben hatten vergleichbare Proteinkonzentrationen. Da aber die ESR-Röhrchen einen unterschiedlichen Durchmesser hatten, sind geringe Intensitätsunterschiede von Spektrum 2 und 3 gegenüber Spektrum 4 in Abb.4 zu sehen.

Die Proteinanalyse und die Atomabsorptionsmessung von Kupfer und Zink ergaben bei Probe a)

Proteinkonzentration: 0,405 mM, Cu: 0,8 mM, Zn: 0,81 mM

Die Übereinstimmung der Werte ist überraschend gut. Sowohl Cu als auch Zn liegen in stöchiometrischen Mengen im Protein gebunden vor (je 2 gAtome/Mol Protein).

Die Analyse der Probe b) führte zu folgenden Meßergebnissen:

Proteinkonzentration: 0,354 mM, Cu: 0,67 mM, Zn: 0,74 mM

Bei diesem Versuch ergaben sich ebenfalls relativ übereinstimmende Werte bezüglich des Metallionengehalts.

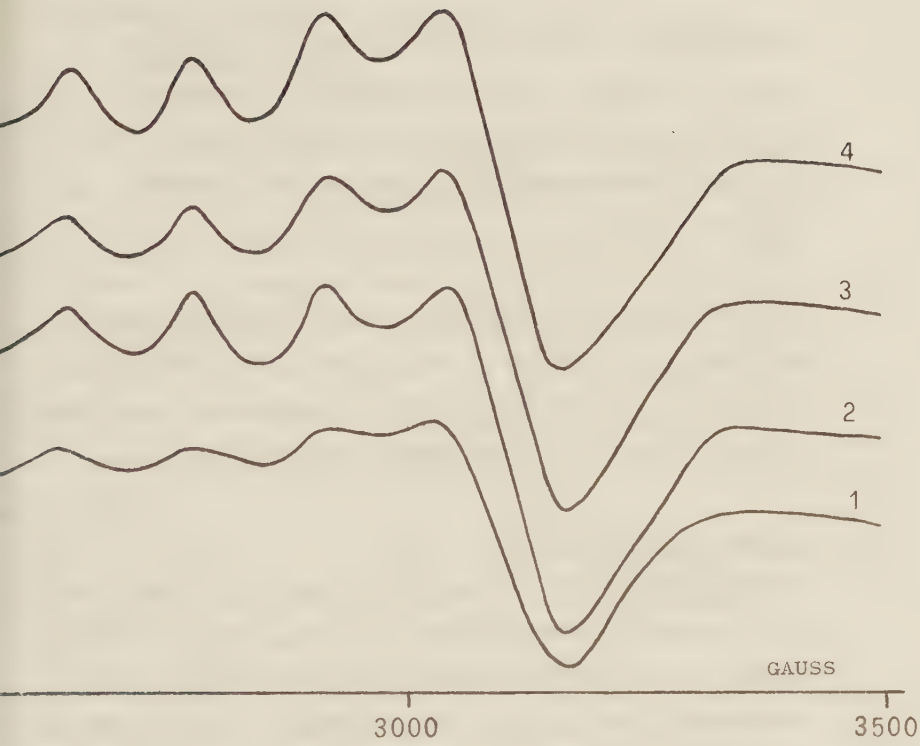


Abb.4: ESR-Spektren von nativem und rekonstituiertem Erythrocuprein
Verstärkung 3200/1600, Feldmitte 3000 Gauss, Temperatur -160°C, Probenvolumen 300 µl. (1) Apoerythrocuprein inkubiert mit stöchiometrischen Mengen Cu^{2+} und Zn^{2+} (13,0 mg/ml). Das gleiche Spektrum erhält man auch mit einem ca. 20%igen Überschuß an Metallionen und anschließender DEAE 23-Trennung. (2) Rekonstituiertes Protein durch Dialyse gegen Cu^{2+} und Zn^{2+} bei pH 4,9 mit darauffolgender DEAE 23-Trennung (13,2 mg/ml). (3) Rekonstituiertes Protein durch Inkubation mit Cu^{2+} und Zn^{2+} (ca. 20% Überschuß), Behandlung mit 1 mM EDTA äquilibrierter Sephadex G 25, pH 6,0 und anschließender DEAE 23-Reinigung (15,0 mg/ml). Sämtliche Präparationsschritte wurden bei 22 - 24°C ausgeführt. (4) Natives Erythrocuprein (13,8 mg/ml).

Nach Dialyse im pH-Bereich von 6 bis 7 wurden ESR-Spektren gemessen, die vergleichbar mit Spektrum 1 in Abb.4 waren. Erst im Bereich von pH 5 wurden die optimalen Bedingungen für diese Rekonstitutionsmethode erreicht.

Diese Ergebnisse geben Grund zu der sicheren Annahme, daß die Metallionen nach den beiden eben geschilderten Rekombinierungsverfahren exakt dieselbe Lage einnehmen, wie es im nativen Erythrocuprein der Fall ist.

3.3.2 Einbau von Kupfer(I)

Die Rekonstitution von Apoerythrocuprein mit Cu(I) in Form von Cu(I)-Acetonitrilperchlorat gelang nur unter absolut O_2-freien Bedingungen. Bei Zutritt von Luftsauerstoff trat spontan eine Oxidation zu Cu(II) ein, die an der auftretenden blaugrünen Farbe der Lösung erkenntlich war. Dieses Cu(II)-Apoprotein entsprach dem durch einfache Inkubation mit Cu(II) erhaltenen. Bei einem vorgelegten Acetonitril-Kaliumphosphatpuffer-Verhältnis in der Apoprotein-Lösung von 50% (v/v), bei der Cu(I) in wässriger Lösung stabil ist, verbleibt zwar das Cu nach Zugabe in der reduzierten Form, wird jedoch ebenfalls nach Entfernen des Acetonitrils durch Luftsauerstoff oxidiert.
Dieses Ergebnis zeigt, daß unter aeroben Bedingungen und ohne Reduktionsmittel kein Cu(I)-Erythrocuprein erhalten werden kann.

Der Einfluß von Kupfer und Zink auf die Stabilität des Erythrocupreins

Die Untersuchung der Stabilität von partiell und vollständig rekonstituiertem, kupferarmem und nativem Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen und unterschiedlicher Wärmebehandlung elektrophoretisch vorgenommen. Die einzelnen Proben wurden auf 25, 45 und 90°C in Gegenwart von 4 M Harnstoff erwärmt und in der Polyacrylamid Gel Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat auf evtl. auftretende Molekülbruchstücke geprüft. Folgende Proteinproben wurden dieser Behandlung unterzogen:

Die Proben b), c) und d) wurden durch direkte Zugabe der Metallionen zum Apoprotein in stöchiometrischen Mengen hergestellt.

a) Apoprotein

b) 2Zn-Apoerythrocuprein mit äquimolaren Mengen Zn^{2+}

c) 2Cu-Apoerythrocuprein mit äquimolaren Mengen Cu^{2+}

d) 2Cu, 2Zn-Apoerythrocuprein mit äquim. Mengen Cu^{2+} u. Zn^{2+}

e) natives Erythrocuprein, das zuvor mit Ferrocyanid reduziert (121) und über eine mit 50 mM KCN bei pH 8,2 äquilibrierte, mit Sephadex G 25 gefüllte Säule bei Raumtemperatur von Kupfer teilweise befreit wurde. Das Produkt enthielt noch 30% des Kupfers und 90% des Zinks verglichen mit dem nativen Erythrocuprein.

f) natives Erythrocuprein

Bei diesem Versuch zeigte sich deutlich der strukturer-

haltende Einfluß des Kupfers. Es trägt in erster Linie zur Stabilität des Proteinmoleküls bei. Es ist zwar zu beobachten, daß Zink zusätzlich stabilisierende Eigenschaften aufweist, der Apoproteinkomplex mit Zink allein sich jedoch ähnlich wie das metallfreie Protein verhält und schon bei 25°C teilweise in Untereinheiten mit Molekulargewichten um 24 000 und 16 000 zerfällt. Beide Präparate wurden bei Erwärmen auf 90°C und schnellem Abkühlen weitgehend denaturiert.

Erstaunlich ist die Beständigkeit des Cu/Zn-Apoproteinkomplexes bei 45°C. Es zeigt sich ausschließlich eine Bande bei Molekulargewicht 32 000. Nach dem Erwärmen auf 90°C und schnellem Abkühlen im Eisbad ist noch eine zusätzliche Proteinbande im Bereich um 24 000 Molekulargewicht sichtbar, wobei die Hauptbande ebenfalls das Molekulargewicht des nativen Proteins aufweist.

In Tabelle 1 sind die einzelnen Ergebnisse zusammengefaßt.

Temperatur (Zeit)	Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ungefähr		
	32 000	24 000	16 000
25°C (2 h)			
Apoerythrocuprein	st	sch	m
2Zn-Apoprotein	m	m	sch
2Cu-Apoprotein	st	m	sch
2Cu,2Zn-Apoprotein	st	-	-
natives Erythrocuprein (kupferarm)	st	-	-
natives Erythrocuprein	st	-	-
45°C (1 h)			
Apoerythrocuprein	st	sch	m
2Zn-Apoprotein	e	e	e
2Cu-Apoprotein	st	st	sch
2Cu,2Zn-Apoprotein	e	e	e
natives Erythrocuprein (kupferarm)	m	m	m
natives Erythrocuprein	st	sch	-
90°C (3 Min.)			
Apoerythrocuprein	e	e	e
2Zn-Apoprotein	e	e	e
2Cu-Apoprotein	-	st	-
2Cu,2Zn-Apoprotein	st	m	-
natives Erythrocuprein (kupferarm)	-	m	sch
natives Erythrocuprein	st	m	-

Tab.1: Beständigkeit von partiell und vollständig rekonstituiertem Apoerythrocuprein, kupferarmem und nativem Protein unter denaturierenden Bedingungen (Erwärmen auf 25, 45 und 90°C in Gegenwart von 4 M Harnstoff). Die Untersuchung der Stabilität erfolgte in der analytischen Polyacrylamid Gel Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat. Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 1,5 Std., 80 V,180 mA. Bez. der Proteinbanden: st = stark, m = mittel, sch = schwach, e = erkennbar.

3.5 Enzymatische Aktivität partiell und vollständig rekonstituierter Metallkomplexe des Apoerythrocupreins

In früheren Arbeiten (151, 152) wurden verschiedene Kupfer- und Zink-Apoerythrocuprein-Komplexe auf ihre Superoxid-Dismutase (SOD) Aktivität untersucht und mit der Aktivität des nativen Proteins verglichen. Danach konnte die Aussage gemacht werden, daß für maximale Aktivität 4 Metallionen erforderlich sind, von denen mindestens 2 Kupfer sein müssen.

Die höchste Aktivität wurde erhalten, wenn 2 Cu und 2 Zn, 3 Cu und 1 Zn oder 4 Cu pro Mol Apoprotein vorhanden waren. Bei einfacher Inkubation der Metallionen bei pH 7,2 war in diesem Fall schon eine 65 - 75%ige Aktivität, verglichen mit dem nativen Protein, zu beobachten. Die Zugabe von 1 Cu mit 1 - 3 Zn verursachte eine SOD-Aktivität von 8 - 25%, während 2 Cu und 3 Cu jeweils ohne Zn 11 bzw. 33% Aktivität bewirkten. Zink alleine war enzymatisch inaktiv.

Mit dem Singulett-Sauerstoff Test (108), bei dem die Beseitigung des reaktiven $^1\Delta_g O_2$ als Maß für die enzymatische Aktivität der Cupreine, deren Substrat er darstellt, dient, zeigten sich bei den einzelnen Metallprotein-Komplexen abweichende Ergebnisse im Vergleich zu den oben angeführten. Mit Cu-Apoerythrocuprein-Komplexen ergaben sich hier drastische Veränderungen, abgesehen davon, daß dieser Test eine erheblich höhere Spezifität als der Cytochrom c-Reduktionstest aufwies (erforderliche Menge natives Protein $3,3 \times 10^{-9}$ M gegenüber

4×10^{-8} M bei 50%iger Hemmung). Es zeigte sich, daß ausschließlich 2 Cu/Mol Protein zum Erreichen der maximalen Aktivität erforderlich sind ($4{,}4 \times 10^{-9}$ M = 80% des nativen Cupreins). Eine weitere Zugabe von Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} hatte keinen Effekt. Die stöchiometrische Menge von 1 Cu/Mol bewirkte ca. 40% Aktivität verglichen mit dem obigen 2Cu-Komplex ($7{,}6 \times 10^{-9}$ M bei 50% Hemmung).

Das Apoprotein, das beim $O_2^{\cdot-}$-Test keine erkennbare Cytochrom c-Reduktion zeigte, hatte jetzt noch eine 0,5 - 1%ige Aktivität gegenüber dem unbehandelten Cuprein, obwohl atomabsorptionsspektroskopisch kein Kupfer festgestellt werden konnte. Es ist anzunehmen, daß dieser Effekt auf entweder nicht im Protein nachweisbare oder von Chemikalien im Reaktionsansatz herrührende Spuren von Kupfer zurückzuführen ist (Tab.2).

Metall-Apoerythrocuprein (gAtome/Mol Protein)	Erforderliche Proteinkonzentration für 50% Hemmung der $^1\Delta_g O_2$ induzierten Chemilumineszenz (108) (Mole x 10^{-9})	Cytochrom c-Reduktion durch $O_2^{\cdot}$ (151, 152) (Mole x 10^{-9})
1 Cu	7,6	1000
1 Cu, 1 Zn	7,8	450
1 Cu, 2 Zn	7,5	280
2 Cu	4,4	310
2 Cu, 1 Zn	4,5	70
2 Cu, 2 Zn	4,6	60
3 Cu	4,7	110
4 Cu	4,6	50
2 Cu, 2 Zn (nat. Erythrocuprein)	3,3	35
Apoerythrocuprein	300 - 500	keine Aktivität
Cu-Aminosäurekomplexe (bezogen auf Cu)	~10 000	~1000

Tab.2: Enzymatische Aktivität verschiedener Cu^{2+}- und/oder Zn^{2+}-Apoerythrocuprein-Komplexe im Vergleich zu nativem Erythrocuprein und niedermolekularen Cu-Komplexen. Die Herstellung der Metall-Proteinkomplexe erfolgte durch Zugabe stöchiometrischer Mengen von Cu^{2+} und Zn^{2+} zu Apoprotein in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2 bei 22°C. Die Zugabe der Metallionen wurde auf das Molekulargewicht von 32 500 bezogen und 1 - 2 Std. vor der Messung vorgenommen.

6 Kobalt-Erythrocuprein

Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße das Zink im nativen Erythrocuprein gegen Kobalt ausgetauscht wird, und dadurch Aufschluß über die Zn-Bindungsstelle im Protein zu bekommen, wurde in einer G 25-Säule Co^{2+} im Überschuß angeboten und das erhaltene modifizierte Protein näher charakterisiert. Das Hauptinteresse lag auf spektroskopischem Gebiet, da Co^{2+} im Gegensatz zu Zn^{2+} licht- und ESR-spektroskopisch aktiv ist. Außerdem wurde die chiroptische und die disk-elektrophoretische Eigenschaft, sowie die Superoxid-Dismutase Aktivität untersucht. Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie wurde ebenfalls herangezogen, um die Bindungsenergien des Kupfers und des Kobalts im Protein zu messen.

.6.1 Präparation

Es wurde angenommen, daß bei schwach saurem pH-Wert (pH 4,3) und Temperaturen zwischen 20 und 25°C ein Kobalt-Zink-Austausch stattfindet. Schon kurze Zeit nach dem Aufbringen des nativen Proteins auf die im oberen Teil des Sephadex G 25-Gels mit Co^{2+} beladene Säule zeigte sich eine starke Farbveränderung des sonst grünblauen Erythrocupreins. Es trat eine intensive Blauviolett-Färbung auf, die auch noch nach Austritt des Proteins aus der Co^{2+}-Zone und nach der Elution bestehen blieb. Der untere Teil der Säule diente sowohl zur Entsalzung und Reinigung von unspezifisch und lose gebundenem Kobalt als auch zur

Änderung des pH-Bereiches (pH 5,4). Die Farbverschiebung während der Präparation deutete schon darauf hin, daß Kobalt in einem gewissen Ausmaß gebunden wurde und die Metallanalyse nach dem Einengen, mehrmaligem Waschen im Kollodium-Membranfilter und einem weiteren G 25-Reinigungsschritt bestätigte die Vermutung.
Bei mehreren Präparationen ergab sich ein Kobalt-Gehalt von 1,7 - 1,8 gAtomen/Mol Protein bei einem Kupfer-Gehalt von 1,8 - 2,0 gAtomen/Mol. Zink konnte nur noch in geringen Mengen (0,25 - 0,4 gAtome/Mol Prot.) festgestellt werden. Tab.3 gibt Übersicht über die bei drei Präparationen durch Proteinanalyse und Atomabsorption ermittelten Werte.

Tab.3

	Cu µg/ml	gAtom/ Mol Prot.	Co	gAtom/ Mol Prot.	Zn	gAtom/ Mol Prot.	Prot. mg/ml
Präp.1	24,3	2,0	20,8	1,8	3,2	0,25	6,4
Präp.2	8,7	1,88	7,3	1,7	1,9	0,4	2,4
Präp.3	2,8	1,81	2,5	1,72	0,4	0,375	0,8

Diese Ergebnisse zeigen eine Austauschrate von Kobalt gegen Zink von 85 - 90%, wobei der Kupfer-Gehalt verhältnismäßig konstant bleibt. Kobalt vermag also lediglich Zink, nicht aber Kupfer aus dem nativen Cuprein zu verdrängen, wodurch anzunehmen ist, daß Kobalt dieselbe Stelle im Protein einnimmt wie ursprünglich Zink. Auch das disk-elektrophoretische Verhalten und die Superoxid-Dismutase-Aktivität waren vollkommen identisch mit den entsprechenden Eigenschaften des unbehandelten Proteins.

Die analoge Herstellung eines Cadmium- und eines Quecksilber-Erythrocupreins nach obiger Säulenmethode war wenig erfolgreich. Cd^{2+} wurde nicht erkennbar und Hg^{2+} nur teilweise ausgetauscht (25 - 30%).

6.2 Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und UV-Bereich

Während das UV-Spektrum des Cu/Co-Erythrocupreins weitgehend unverändert bleibt, weist das Spektrum im sichtbaren Bereich drastische Änderungen im Vergleich zum Cu-Zn-Protein auf (Abb.5). Es treten Absorptionsmaxima bei 598 und 570 nm und Schultern bei 540 und 440 nm auf. Aus Tab.4 sind die spektroskopischen Daten im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ersichtlich.

Tab.4:

		(16)	(42)		(16)	(42)
		λ (nm)		molarer Extinktionskoeffizient ϵ		
Maximum	598	592	598	920	600	740
	570	558	568	800	525	620
Schulter	530	532	534	600	385	430

Das ergibt einen molaren Extinktionskoeffizienten für 1 gAtom Co/Mol Protein von 460, also rund dreimal höher als für Kupfer (ϵ^{M}_{680} = 150). Erstaunlich ist, daß die Absorption bei 680 nm für das Cu/Co-Protein im Vergleich zum Cu/Zn-Protein erheblich erniedrigt ist. Gibt man jedoch zu 2 Co-Apoerythrocuprein äquimolare Mengen Cu^{2+},

so erscheint bei diesem Produkt die Cu-Absorptionsbande im Bereich von 680 nm mit fast unverminderter Intensität.

3.6.3 CD-Spektrum

Im CD-Spektrum (Abb.6) zeigen sich, verglichen mit dem nativen Protein, erhebliche Veränderungen, abgesehen vom UV-Bereich. Um 500 nm tritt ein Cottoneffekt auf, der dem Kobalt zugeschrieben werden kann. Eine weitere Veränderung ist auch bei 345 nm zu beobachten. Hier wird eine aufgelöste Absorptionsbande sichtbar, während das Cu/Zn-Protein an dieser Stelle lediglich eine Schulter besitzt. Zudem ist die Absorption stark erhöht. Auffallend ist auch der niedrige Cottoneffekt des Cu/Co-Proteins bei 600 nm, der nach kürzeren Wellenlängen verschoben ist.

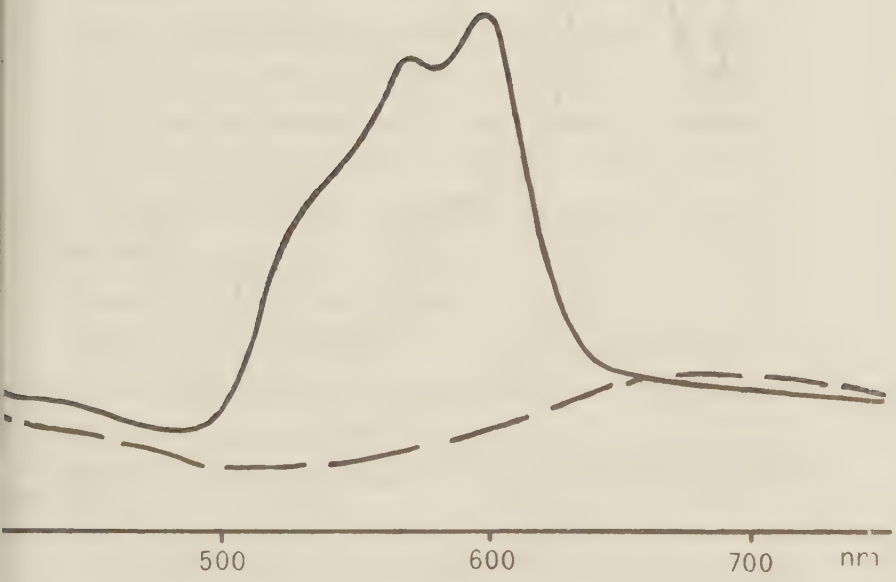


Abb.5: Optische Spektren von nativem und Kobalt-Erythrocuprein. Proteinkonzentration jeweils 6,5 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2. Darstellung des Cu/Co-Proteins: Natives Erythrocuprein wurde auf eine mit 100 mM Acetat-Puffer, pH 5,4, äquilibrierte Säule (Sephadex G 25, 15 x 600 mm) aufgetragen. Der obere Teil des Gels enthielt 20 ml 500 mM $CoCl_2$, pH 4,3. Elution mit 100 mM Acetat-Puffer, pH 5,4 bei Raumtemperatur; Umsalzung auf Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2 — — — natives Erythrocuprein, ———— Kobalt-Erythrocuprein. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in 1 cm Küvetten.

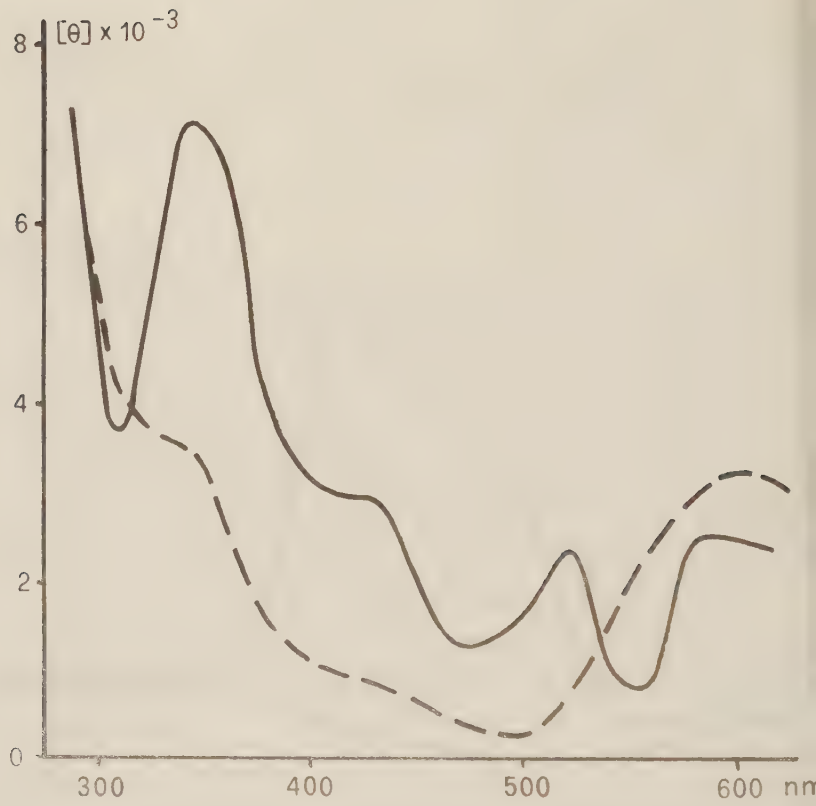


Abb.6: CD-Spektren von nativem und Kobalt-Erythrocuprein.
Die Messungen wurden bei 20°C in 10 mm Küvetten durchgeführt. Die Proteinproben waren in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer gelöst. ——— Kobalt-Erythrocuprein (3,6 mg/ml), —— —— natives Erythrocuprein (6,5 mg/ml).

6.4 ESR-Messungen von Kobalt-Erythrocuprein

Sowohl das durch Austausch von Zink durch Kobalt auf der Säule gewonnene, als auch das durch Zugabe äquimolarer Mengen an Cu^{2+} und Co^{2+} zu Apoprotein hergestellte 2Cu2Co-Protein gaben mit dem zur Verfügung stehenden ESR-Gerät und unter den Temperaturbedingungen der Messungen (-160°C) absolut kein ESR-Signal. Das Cu(II)-Signal des nativen Proteins war vollkommen verschwunden, während das zu erwartende Co(II)-Signal ebenfalls ausblieb. Diese Tatsache ließ vermuten, daß Cu^{2+} und Co^{2+} in starke Wechselbeziehung treten, d.h. durch ihre sterische Nachbarschaft Spin-Spin-Paarung eintritt. Es kann aber auch sein, daß Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert wird, während Co^{2+} in Co^{3+} übergeht. Wenn eine Spin-Spin-Kopplung vorliegt, besteht die Möglichkeit, durch verschiedene Reduktionsmittel Cu^{2+} in Cu^{1+} zu überführen. Außerdem kann man durch Reagenzien wie Harnstoff und Guanidin (4 - 6 M) die Proteinstruktur verändern und dadurch ein Auseinanderrücken der Metallionen bewirken, wodurch die paramagnetischen Eigenschaften von Cu^{2+} und Co^{2+} wieder auftreten können. Aus diesem Grund wurde das modifizierte Protein mit den proteinentfaltenden Reagenzien behandelt, was aber keinen Erfolg brachte. Ebenso konnte durch Reduktion des Cu^{2+} mit Na-Dithionit, K—Ferrocyanid und 2-Mercaptoäthanol kein Co^{2+}-Signal erhalten werden, obwohl sofort nach Zugabe des Reduktionsmittels eine deutliche Farbänderung

des Proteins von blauviolett nach hellrot eintrat. Das bedeutet, daß Cu^{2+} tatsächlich reduziert wurde und nur noch das Absorptionsspektrum des Co^{2+}-Proteins bestehen blieb. Dieses stimmt mit dem sichtbaren Spektrum des 2Co-Apoerythrocuprein-Komplexes exakt überein (Abb.7).

Da eine Reoxidation der reduzierten Proben durch Luftsauerstoff innerhalb von ca. 10 Stunden zu beobachten war, wurden die ESR-Röhrchen mit 2-Ring Stickstoff begast und mit Parafilm verschlossen. Unter diesen Bedingungen blieben die Proben im reduzierten Zustand.

Die Reduktionsbedingungen waren im einzelnen:

a) 300 µl Cu/Co-Erythrocuprein (15 mg/ml)
   + 50 µl $Na_2S_2O_4$ (20 mg/ml)

b) 300 µl Cu/Co-Erythrocuprein (15 mg/ml)
   + 0,4 mg $K_4[Fe(CN)]_6 \times 3\ H_2O$

Die Probe wurde über N_2-begastes Sephadex G 25 von Ferrocyanid gereinigt, um kein Fe(III)-ESR-Signal zu bekommen.

c) 300 µl Cu/Co-Erythrocuprein (15 mg/ml)
   + 20 µl Mercaptoäthanol

Es wurden außerdem noch ESR-Messungen des 2Co-Apoerythrocupreins und der Co(II)-Komplexe von Histidin, Lysin und Tyrosin durchgeführt. Aber auch diese blieben erfolglos, was sicherlich auf Spin-Spin-Kopplung des Kobalt(II) untereinander zurückzuführen ist. Für die Messungen wäre die Temperatur von flüssigem Helium erforderlich (-270°C), das jedoch nicht zur Verfügung stand.

Kobalt-Apoerythrocuprein

Zur weiteren Untersuchung der Kobalt-Bindung wurden verschiedene Kobalt-Apoerythrocuprein-Komplexe hergestellt. Dialyse von metallfreiem Protein gegen Co^{2+} bei pH 4,7 und anschließende Reinigung über DEAE 23 ergab ein Produkt mit einem Co-Gehalt von 1,9 gAtomen/Mol Protein (Prot.Konz.: 6,5 mg/ml, Co: 22,0 µg/ml). Es war keine Superoxid-Dismutase Aktivität und ebenfalls kein Co(II)-ESR-Signal zu finden. Das disk-elektrophoretische Verhalten des Proteins war identisch mit dem des Apoerythrocupreins und Zink-Apoprotein-Komplexes. Im Absorptionsspektrum zeigten sich keine Unterschiede zu einem 2Co-Apoprotein (Abb.7), das durch einfaches Hinzufügen äquimolarer Mengen Co^{2+} zu Apoerythrocuprein hergestellt wurde. Die Form der Absorptionskurve deckt sich auch mit dem sichtbaren Spektrum des Cu(I)/Co(II)-Proteins. Bei 2 Co/Mol Protein ist keine Zunahme der Absorption mehr festzustellen, während sie bis zu diesem Molverhältnis linear ansteigt. Schultern treten bei 540 und 570 nm auf, wobei das Maximum im Vergleich zum Cu(II)/Co(II)-Protein-Spektrum um 10 nm nach kürzeren Wellenlängen verschoben ist (588 nm). Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon^{M}_{588} = 950$ gegenüber $\epsilon^{M}_{598} = 920$. Das UV-Spektrum entspricht dem des Apoerythrocupreins (Abb.1).

Wurde Apoerythrocuprein gegen Co^{2+} und Zn^{2+} gemeinsam dialysiert und ebenfalls über DEAE 23 gereinigt, so war überraschenderweise überhaupt kein Kobalt im Protein

nachzuweisen. Zink dagegen war in einem Molverhältnis von 2 gAtomen/Mol Protein enthalten (Prot.Konz.: 19,2 mg/ml; Zink: 86,6 µg/ml). Dieser Versuch zeigt die beachtliche Spezifität des Erythrocupreins gegenüber Zink.

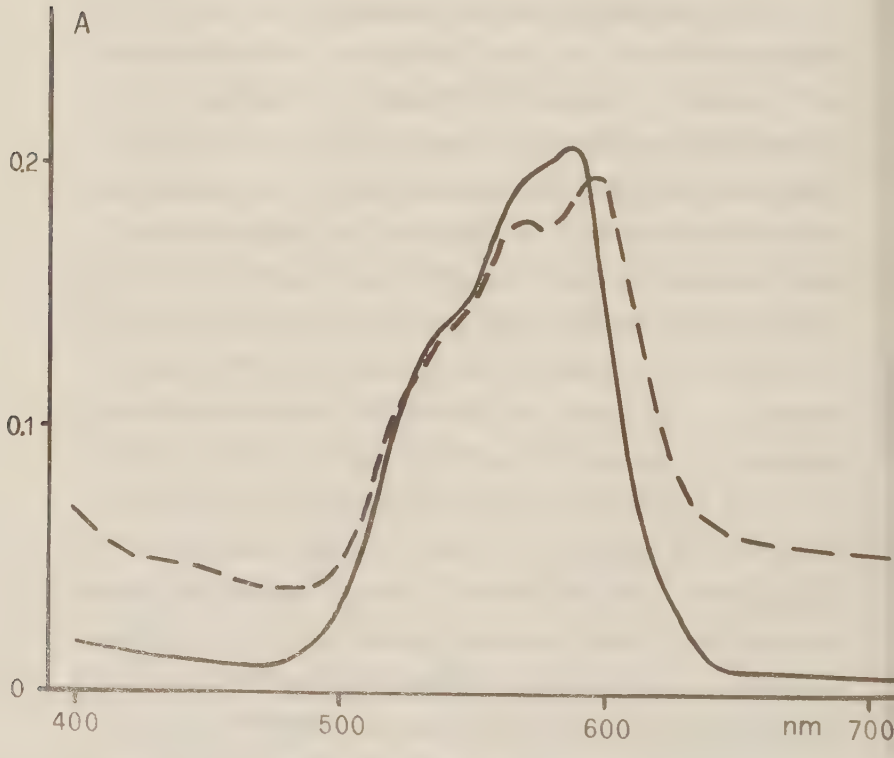


Abb.7: Optische Spektren von Cu/Co-Erythrocuprein und Co-Apoerythrocuprein. Proteinkonzentration jeweils 6,5 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in 1 cm Küvetten. ——— 2Co-Apoerythrocuprein (das Spektrum ist identisch mit dem des durch Na-Dithionit reduzierten Cu/Co-Proteins), — — — 2Cu/2Co-Erythrocuprein.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie von verschiedenen modifizierten Cupreinen

Nachdem das native Erythrocuprein mit Hilfe des XPS-Verfahrens auf seine Metallbindungsverhältnisse untersucht wurde (64, 65), war die Anwendung dieser Methode auf verschiedene Metallkomplexe des Apoproteins und des Kobalt-Erythrocupreins in Verbindung mit Modellkomplexen von besonderem Interesse.

Die Apoprotein-Komplexe mit Cu, Zn und Co wurden aus 0,1 µMol Apoerythrocuprein nach Inkubation mit jeweils 0,4 µMol $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, $ZnCl_2$ und $CoCl_2 \times 6\ H_2O$ hergestellt. Unspezifisch gebundene Metallionen wurden durch Gelfiltration (Sephadex G 25, 10 x 200 mm) entfernt, wobei die Proben durch die Elution mit H_2O bidest. gleichzeitig vollständig entsalzt wurden. Der Metallionengehalt der einzelnen Komplexe sowie die Bindungsenergien $E(Me\ 2p_{3/2})$ sind aus Tab.5 ersichtlich. Daraus kann man erkennen, daß jeweils mehr als 2 gAtome Me^{2+}/Mol Protein gebunden blieben, ein Teil der Metallionen also zusätzliche Bindungsstellen des Cupreins besetzt. Deshalb wären auch unterschiedliche Signale zu erwarten gewesen, da die überschüssigen Metallionen ja in einer anderen chemischen Umgebung sitzen und dadurch eine veränderte Bindungsenergie aufweisen müssten. Dies war aber nur bei dem Co-Apoerythrocuprein der Fall. Das Röntgenphotoelektronenspektrum weist hier tatsächlich zwei diskrete, 4 eV auseinanderliegende Signale bei 786,2 und 782,2 eV ungefähr gleicher Intensität auf (Abb.8a)).

Dagegen zeigt das Kobalt-Erythrocuprein, bei dem am nativen Protein Zink gegen Kobalt ausgetauscht wurde, ein breites, nicht aufgelöstes Maximum zwischen 781-790eV. Dieses Signal weist den für paramagnetische Co(II)-Verbindungen charakteristischen steilen Abfall nach niedrigen Bindungsenergien auf (66, 67) und läßt sich in seiner Intensität nur schwer abschätzen. Auffallend ist die starke chemische Verschiebung der Bindungsenergien der Co-Proteinkomplexe gegenüber den Co(II)-Komplexen von Histidin, Lysin und Tyrosin, deren Co-Signale bei 780,7 $\pm$ 0,4 eV auftreten. Das Co(II)-Signal des Co-Aquo-Komplexes liegt allerdings bei 782,0 eV, der Bindungsenergie des einen Signals beim Co-Apoprotein. Eine Beteiligung an der breiten Bande des Kobalt-Erythrocupreins kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die Cu-$2p_{3/2}$-Signale beim Cu-Apoprotein und dem Kobalt-Erythrocuprein (932,6 eV) sind im Vergleich mit dem Cu-Signal des nativen Proteins (931,9 eV) verändert, weisen aber gegenüber verschiedenen Cu-Aminosäurekomplexen noch immer eine beachtliche chemische Verschiebung auf. Diese Bindungsenergien liegen im Bereich von 934,0 $\pm$ 0,3 eV (63, 65, 105). Trotz eines Cu-Gehalts im Cu-Apoerythrocuprein von 3,1 Cu/Mol Protein, tritt nur ein Signal von gleichartig gebundenem Kupfer auf.

Das Zn-$2p_{3/2}$-Signal liegt im Bereich der Zn-Aminosäurekomplexe (1021,0 $\pm$ 0,4 eV) (63, 65, 105). Das Maximum ist hier bei 1021,5 eV während es beim nativen Protein bei 1020,5 eV liegt (Tab.5).

Die Bindungsenergie des Schwefels liegt bei allen Proteinproben bei 163,0 ± 0,1 eV. Dieser Wert entspricht den S-2p-Signalen der Aminosäuren Cystin, Cystein und Methionin (67).

Probe	Metallionengehalt	E (Cu) (eV)	E (Zn) (eV)	E (Co) (eV)
2 Cu, 2Zn-Erythrocuprein (nativ)	Cu 2,05 Zn 2,01	931,9	1020,5	
Cu-Apo-EC	Cu 3,10	932,6		
Zn-Apo-EC	Zn 2,50		1021,5	
Co-Apo-EC	Co 3,10			786,2 u. 782,2
2 Cu, 2 Co-EC	Cu 1,82 Co 1,73	932,6		breites Max. 790 - 781
Co-(Tyrosin)$_2$				781,0
Co-(Histidin)$_2$				780,8
Co-(Lysin)$_2$				780,4
Cu-AS-Chelat-Komplexe	Me: AS=1:2	934,0 ± 0,3		
Zn-AS-Chelat-Komplexe	Me: AS=1:2		1021,0 ± 0,4	

Tab.5: Bindungsenergien E der Metallionen ($2p_{3/2}$) von Erythrocuprein (EC) und Aminosäurekomplexen, kalibriert auf $E_{(C-1s)}$ = 284,0 eV. Der Metallionengehalt wurde durch Atomabsorptionsmessung und Proteinbestimmung errechnet und als molarer Metallgehalt in g pro 32 600 g Protein angegeben.

Abb.8 a)

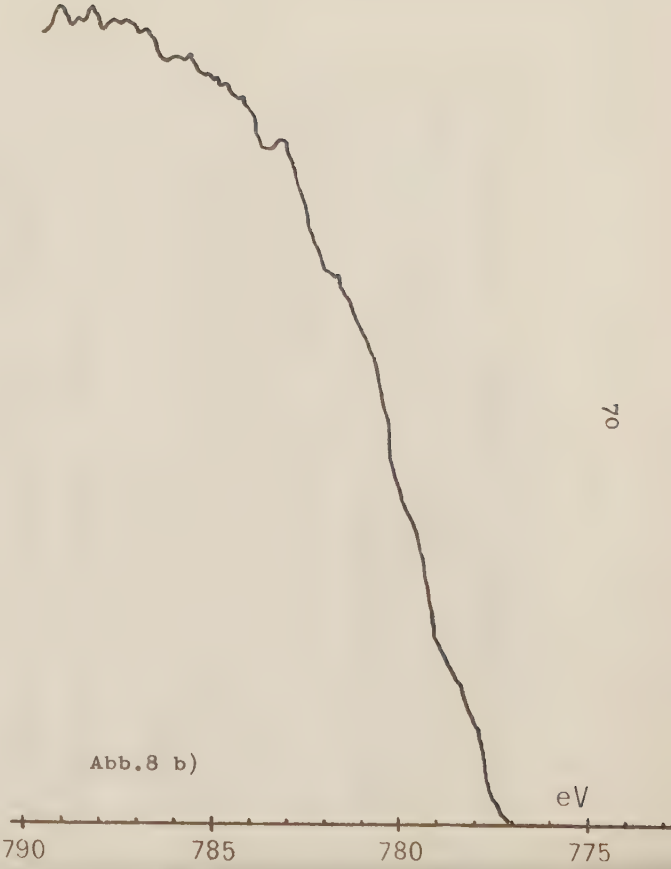


Abb.8 b)

Abb.9 a)

Abb.9 b)

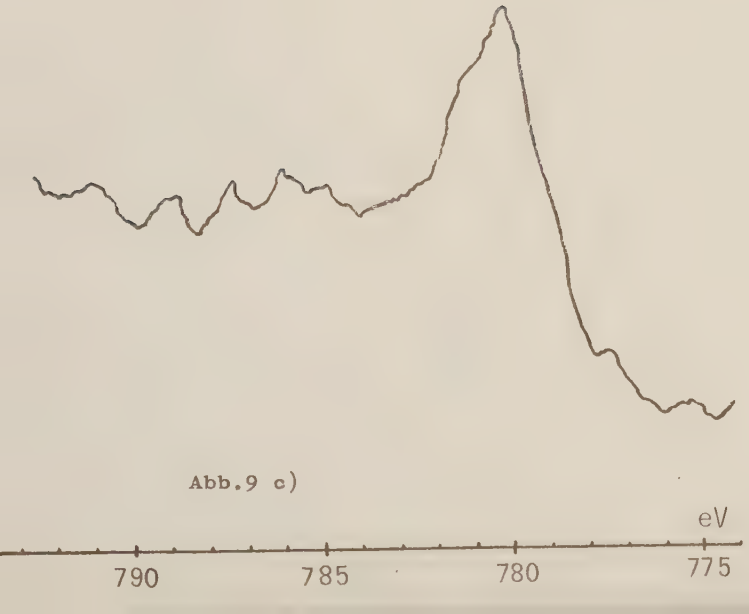


Abb.9 c)

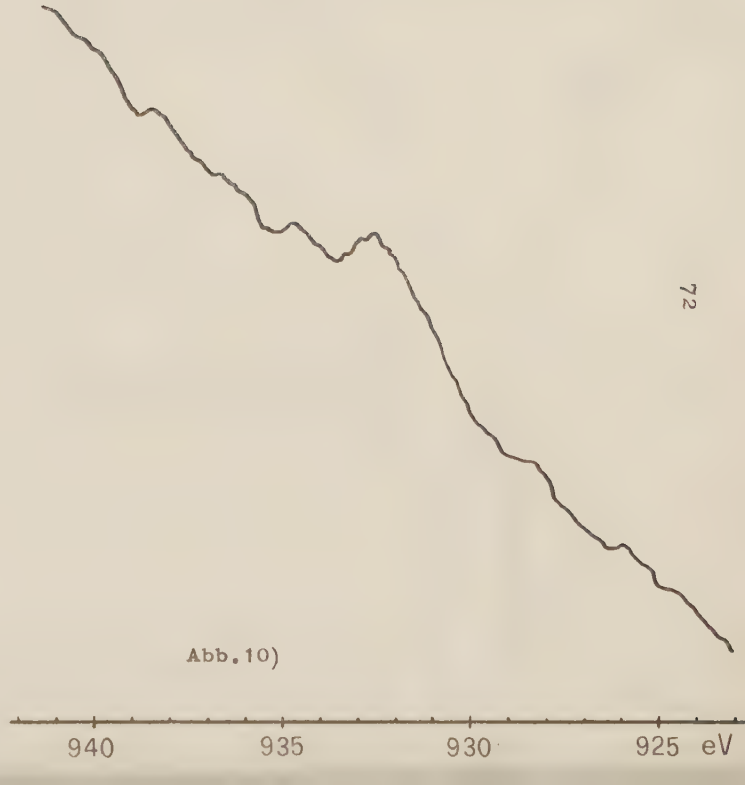


Abb.10)

Abb.11 a)

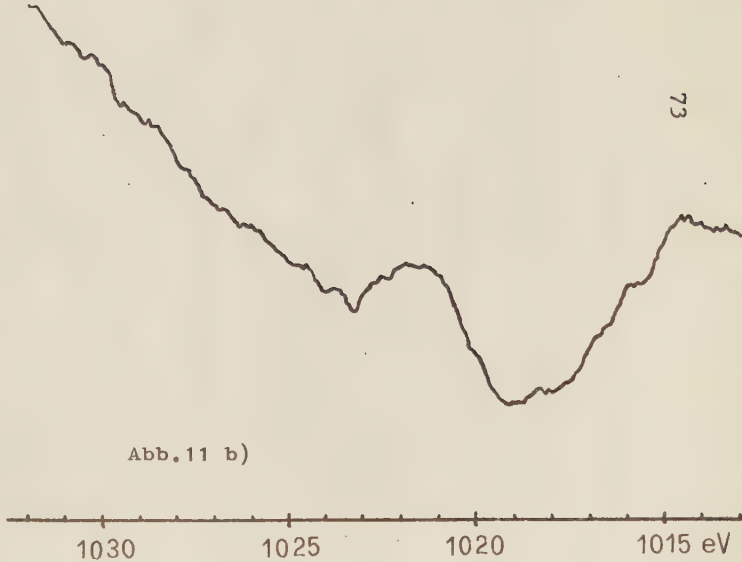


Abb.11 b)

Legenden zu den Abbildungen 8 - 11.

Abb.8: Röntgenphotoelektronenspektren des Co-$2p_{3/2}$-Niveaus von
a) Co-Apoerythrocuprein und
b) 2Cu,2Co-Erythrocuprein.
Aufnahmebedingungen: Röntgenstrahlenenergie: 1253,6 V; smoothing over 11 points; work funktion 6 eV; analyzer energy 100 eV; sweep width 20 eV; No. of channels 200;
a) sweep time 30 s; No. of scans 5000;
b) sweep time 60 s; No. of scans 200.

Abb.9: Röntgenphotoelektronenspektren des Co-$2p_{3/2}$-Niveaus von
a) Co-$(Tyrosin)_2$
b) Co-$(Histidin)_2$
c) Co-$(Lysin)_2$
Aufnahmebedingungen: Röntgenstrahlenenergie: 1253,6 V; smoothing over 15 points; work funktion 6 eV; analyzer energy 100 eV; sweep width 20 eV; sweep time 20 s; No. of channels 200; No. of scans 25.

Abb.10: Röntgenphotoelektronenspektrum von 2Cu,2Co-Erythrocuprein (Cu-$2p_{3/2}$-Niveau)
Aufnahmebedingungen: Röntgenstrahlenenergie: 1253,6 V; smoothing over 15 points; work funktion 6 eV; analyzer energy 100 eV; sweep width 20 eV; sweep time 30 s; No. of scans 200; No. of channels 200.

Abb.11: Röntgenphotoelektronenspektren von
a) Cu-Apoerythrocuprein (Cu-$2p_{3/2}$-Niveau)
b) Zn-Apoerythrocuprein (Zn-$2p_{3/2}$-Niveau)
Aufnahmebedingungen: Röntgenstrahlenenergie: 1253,6 V; smoothing over 15 points; work funktion 6 eV; analyzer energy 100 eV; sweep width 20 eV; No. of channels 200;
a) sweep time 20 s; No. of scans 1000;
b) sweep time 60 s; No. of scans 200.

.9 Polyäthylenimin-Histidin-Cu(II) als Enzymmodell für Erythrocuprein

Es wurde angenommen, daß Polyäthylenimin durch seine besondere proteinähnliche Struktur geeignet ist, als Grundgerüst für ein Erythrocuprein-Modell zu dienen. Die Substanz besitzt ein Molekulargewicht um 50 000 und ist stark verzweigt, wobei eine große Anzahl von primären Aminogruppen vorliegt (25% aller Aminogruppen). Die Elementaranalyse ergab: 55,2% Kohlenstoff, 29,5% Stickstoff, 12,3% Wasserstoff.

Ein Teil der primären Aminogruppen wurde mit der Aminosäure Histidin peptidartig verknüpft, da vermutet wird, daß Histidin das aktive Zentrum des Enzyms darstellt, (44, 138) und sollte mit Kupfer einen Komplex bilden, der möglicherweise dem des Erythrocupreins ähnlich ist. Diese Annahme kann gemacht werden, weil durch die statistische Verteilung von gebundendem Histidin und verhältnismäßig vielen primären, sekundären und tertiären Aminogruppen die Ausbildung eines "pseudoaktiven" Zentrums begünstigt sein kann. Da verschiedene Cu-Komplexe von Aminosäuren eine geringe Superoxid-Dismutase-Aktivität besitzen(61), könnte von diesem mit Histidin verbundenen Enzymmodell ebenfalls eine katalytische Aktivität erwartet werden.

.9.1 Synthese

Die Syntheseprodukte mit N,N'-Carbonyldiimidazol und Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungskomponenten zeigten ein vollkommen gleichartiges Verhalten. In beiden Fällen

war eine Verknüpfung des geschützten Histidins mit Polyäthylenimin festzustellen. Dies wurde durch Gelfiltration und Ultrafiltration nachgeprüft. Die gefärbte Komponente (Nitrophenylreste) blieb in der hochmolekularen Fraktion gebunden.

Bei einem Molverhältnis der primären Aminogruppen zu BOC-DNP-His von 15 : 1 fiel gleich während der Präparation ein unlöslicher, rotbrauner Niederschlag aus, was eine starke intramolekulare Vernetzung vermuten läßt. Erst bei einem Verhältnis von 15 : 0,3 blieb die Reaktionsmischung in Lösung.

Die hydrophile Eigenschaft des in CH_2Cl_2 gelösten Copolymeren ist beachtlich. Dies zeigt sich im spontanen Übergang des Produkts von der organischen in die wässrige Phase.

3.9.2 Abspaltung der Nitrophenylgruppen

Die Abspaltung der Nitrophenylreste vom Imidazolring des Histidins machte erhebliche Schwierigkeiten und konnte nur teilweise vollzogen werden, obwohl die Thiolysemethode mit Mercaptoäthanol das zur Zeit geeignetste Verfahren für diese Reaktion darstellt (130). Selbst eine tagelange Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Mercaptoäthanol vermochte die Schutzgruppen nicht vollständig abzuspalten. Der Zusatz von 4 M Harnstoff erhöhte die Thiolysewirkung nicht.

.9.3 Der Cu(II)-Komplex des Polyäthylenimin-Histidins; enzymatische Aktivität

Der Cu(II)-Komplex des Copolymeren erwies sich als äußerst stabil, wie durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 und Ultrafiltration nachgewiesen wurde.

Der Metallkomplex bildete sich durch Zugabe von $CuSO_4$ zu Polyäthylenimin-Histidin in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2. Die Konzentration des Copolymeren betrug 2×10^{-4}M, die des Cu(II) 5×10^{-4}M.Im Absorptionsspektrum trat ein Maximum bei 650 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von ~300 auf. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem des Erythrocupreins.

Histidin wurde mit diazotierter Sulfanilsäure nachgewiesen. Hierbei bildete sich ein leuchtend roter Farbstoff.

Der Cu(II)-Komplex des unbehandelten Polyäthylenimins mit einer Polymerenkonzentration von $1,5 \times 10^{-4}$ M (7,5 mg/ml) und einer Cu(II)-Konzentration von 5×10^{-4} M war ebenfalls beständig und war intensiv blau gefärbt.

Beide Komplexe zeigten bei der Löschung der durch $^1\Delta_g$ O_2-induzierten Chemilumineszenz keine meßbare enzymatische Aktivität (<1%). Die erhaltenen Werte lagen im Bereich der Aktivität von Cu(II)-Aminosäurekomplexen (2×10^{-5} M auf Kupfer bezogen (108)).

4. DISKUSSION

4.1 Kristallisation von Erythrocuprein

Die Kristallisationstechnik mit Hilfe einer gesättigten Erythrocuprein-Lösung war erfolgreich und führte zur Bildung von orthorhombischen Erythrocupreinkristallen mit Kantenlängen bis zu 0,4 mm, die jedoch nur bei Temperaturen bis max. 4°C ihre Form und Größe beibehielten. Im Gegensatz dazu waren die monoklinen Proteinkristalle, die bei 22°C in 60% 2-Methylpentandiol (2,4) gezogen wurden, vollkommen temperaturbeständig, waren aber durch ihre lange, dünne Gestalt äußerst zerbrechlich. Richardson, Bier und Richardson (117) erhielten ebenfalls eine orthorhombische Kristallform des Cupreins bei 4°C und eine monokline Form in 58% Methylpentandiol auf ähnliche Art wie die hier geschilderte. Aus Röntgenaufnahmen konnten beim dimeren Molekül (2 Moleküle Erythrocuprein) 4 Untereinheiten pro asymmetrischer Raumeinheit festgestellt werden. Weitere Aussagen über die Struktur des Proteins konnten mit dieser Methode allerdings bis jetzt noch nicht gemacht werden.

4.2 Apoerythrocuprein und Rekonstitution mit Kupfer und Zink

Die Präparation des Apoerythrocupreins mit Hilfe der Säulentechnik stellt eine elegante Methode zur Herstellung von Apoproteinen im Vergleich zum üblichen Dialyseverfahren dar. Das Holoprotein wird gleich in einem

Schritt von der Metallkomponente befreit und vor dieser als reines Apoprotein aus der mit Komplexbildner äquilibrierten Säule getrennt eluiert. Die Methode ist zudem erheblich zeitsparend, so daß man nach 8 - 10 Stunden das metallfreie Protein erhält (149, 151). Die Dialysetechnik erfordert im Fall des Erythrocupreins, eines äußerst stabilen Metallproteins, mehrere Tage. Bei einer Dialysedauer von nur 12 Stunden gegen 10^{-3} M EDTA wie von McCord (23) und Rotilio et al. (121) und Fee (39, 40) durchgeführt, ergibt sich jeweils noch ein Restmetallgehalt von 5 - 10%. In dem durch Gelfiltration gewonnenen Apoerythrocuprein war jedoch weder Kupfer noch Zink nachzuweisen. Die physiko-chemischen Eigenschaften des metallfreien Proteins sind in einer früheren Arbeit dieses Laboratoriums beschrieben (151).

Um eine Kontrolle zu erhalten, ob das Apoprotein durch das bei der Präparation verwendete EDTA nicht kontaminiert ist, wurde dem EDTA-Puffer ^{14}C-EDTA zugesetzt. Sollte EDTA entweder mit den Serinresten des Proteins verestert oder an anderer Stelle gebunden sein, so würden bei Rekonstitutionsversuchen mit Metallionen unerwünschte Nebeneffekte auftreten. Der Komplexbildner könnte zusätzlich Metallionen binden und würde dadurch zu verfälschten Ergebnissen führen (142).

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte ein EDTA-Gehalt von $<0{,}5$ Mol/300 Aminosäurereste des Apoerythrocupreins festgestellt werden. Dieser niedrige Wert ist für das

Proteinmolekül ohne Bedeutung, so daß nach der Entsalzung über Sephadex G 25 das gereinigte Apoprotein als EDTA-frei bezeichnet werden kann.

Durch verschiedene Methoden, die Metallionen Cu^{2+} und Zn^{2+} in Apoerythrocuprein einzubauen, gelang es, rekonstituierte Proteine herzustellen, die im enzymatischen Verhalten und in allen physiko-chemischen Kriterien mit dem nativen Enzym übereinstimmen. Besonders die ESR-Spektroskopie hat sich als Methode bewährt, den Grad der Nativität dieser Präparate festzustellen. Schon das durch einfache Inkubation von Cu^{2+} und Zn^{2+} hergestellte 2Cu,2Zn-Apoprotein und das 4Cu-Apoprotein zeigten ESR-Spektren, die charakteristisch für Erythrocuprein sind. Nur waren hier jeweils Signalverbreiterungen in den $A_{\parallel}$-Werten zu beobachten. Dieser Effekt trat auf, obwohl beim 2Cu,2Zn-Protein kein überschüssiges Kupfer enthalten ist. Daraus könnte man eine geringfügige Konformationsänderung des Proteinanteils und somit eine leichte räumliche Lageverschiebung der Cu^{2+}-Liganden vermuten. Es ist auch möglich, daß nur ein Teil des Cu^{2+} an der richtigen Stelle im Protein, der Rest aber unspezifisch gebunden ist und dadurch ein verändertes ESR-Signal bewirkt.

Ganz anders sieht es im Fall der aufwendiger rekonstituierten Proteine aus. Hier ist eine weitgehende Übereinstimmung der ESR-Spektren im Vergleich zum nativen Enzym zu sehen. Dies beweist, daß keine konformativen Veränderungen im Protein auftreten und daß der Vorgang

des Aus- und Einbaus der Metallionen reversibel ist. Es wurde festgestellt, daß die Rekonstitution im schwach sauren pH-Bereich (pH 5 - 6) am besten verläuft, wie auch das Entfernen der Metalle mit EDTA nur im Bereich von mindestens pH 4 möglich ist. Auch scheint die Zeit bei der Zugabe der Metallionen eine Rolle zu spielen. Das langsame Eindiffundieren von Cu^{2+} und Zn^{2+} in die Proteinlösung, wie es unter Dialysebedingungen der Fall ist, ermöglicht offensichtlich einen optimalen Einbau. Die Proteinliganden benötigen wahrscheinlich eine gewisse Zeit, um die geeignete Konformation bezüglich der Metallionen einzunehmen. Erst dann kann die Komplexbildung in ihrer ursprünglichen Form stattfinden. Selbst bei einfacher Inkubation von Apoprotein mit äquimolaren Mengen an Cu^{2+} und Zn^{2+} bei pH 7,2 war durch Messung der UV-Absorption eine intramolekulare Veränderung innerhalb von ca. 5 Stunden zu beobachten, die sich in einer Zunahme der Absorption von 10 - 15% äußerte. In ähnlicher Weise kann man sich den Rekonstitutionsprozess bei dem durch Zugabe von Cu^{2+} und Zn^{2+}, Passieren durch eine mit 10^{-3} M EDTA äquilibrierte G 25-Säule und anschließender DEAE 23-Behandlung hergestellten rekombinierten Protein vorstellen. Hier könnte durch den Komplexbildner bei pH 6,0 eine bessere Umorientierung der Metalle zu ihren Liganden eintreten, wobei nur das tatsächlich benötigte Cu und Zn seine ursprüngliche Bindungsstelle besetzt. Überschüssige Metallionen werden von EDTA komplexiert. Fee (41) erhielt mit Hilfe eines Dialyseverfahrens ähnliche Ergebnisse.

In früheren Arbeiten (55, 151) wurde ein durch eine Zwei-Säulentechnik hergestelltes anaerob rekonstituiertes Protein beschrieben. Es erwies sich in seinem ESR-Verhalten gegenüber dem bei pH 7,0 durch äquimolare Mengen Kupfer und Zink aerob inkubierten Apoprotein entscheidend vollständiger rekombiniert. Es stellte sich nun heraus, daß die Ursache dafür in einem pH-Effekt zu suchen ist. Durch das Auftreffen des in saurem pH-Milieu (pH 3,8) befindlichen Apoproteins auf das $CuSO_4$ und $ZnCl_2$ im oberen Teil der zweiten Säule war ein pH-Bereich geschaffen, bei dem eine Rekonstitution am günstigsten verläuft (pH 5). Die anaeroben Bedingungen an sich waren nicht ausschlaggebend.

Der Versuch eines Einbaus von Cu(I) in Apoerythrocuprein in Form von Cu(I)-Acetonitrilperchlorat zeigt, daß unter aeroben Bedingungen und ohne Reduktionsmittel kein Cu(I)-Erythrocuprein erhalten werden kann. Das spontan oxidierte Produkt hatte die gleichen Eigenschaften wie das von vornherein mit Cu(II) inkubierte Apoprotein.

Eine entscheidende Beteiligung der Metallionen Cu^{2+} und Zn^{2+} an der Stabilität des Proteinmoleküls ist offensichtlich, was durch die Wärmebehandlung mit 4 M Harnstoff an verschiedenen Metall-Apoprotein-Komplexen nachgewiesen wurde. So ist im Gegensatz zu dem sehr stabilen nativen Erythrocuprein das metallfreie Protein in hohem Maße wärmeempfindlich und zerfällt bereits

deutlich bei 25°C unter den angewandten Testbedingungen. Zink allein scheint die Stabilität des Apoproteins sogar noch herabzusetzen, während der Beitrag des Zinks in Gegenwart von Kupfer eindeutig auf einen strukturstabilisierenden Einfluß im Vergleich mit Kupfer allein schließen läßt. Dieser strukturelle Beitrag des Zinks wurde schon mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und UV-Bereich von Weser et al. (151) festgestellt.
Die Reihenfolge der Stabilitätszunahme ist:
2Zn-Apoprotein < Apoprotein < 2Cu-Apoprotein < 2Cu,2Zn-Apoprotein
Der Einfluß von Trypsin auf natives und metallfreies Protein wurde ebenfalls in der Polyacrylamid-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Metallkomponente des Proteins eine absolute Proteaseresistenz gegenüber Trypsin bewirkt (Hartmann 1973). Das Apoprotein erlitt dagegen einen erkennbaren proteolytischen Abbau, wodurch wieder der essentielle Charakter von Kupfer und Zink bestätigt wird. Forman und Fridovich (45) haben gleichermaßen mit Proteasen die Empfindlichkeit von Erythrocuprein und Apoprotein durch Messung der Superoxid-Dismutaseaktivität ermittelt. Dabei zeigte sich bei der Behandlung mit Trypsin und Chymotrypsin kein Aktivitätsverlust beim nativen Enzym, während das Apoenzym nach Zugabe von

Cu^{2+} und Zn^{2+} einen Verlust von 80 bzw. 75% aufwies. Durch Carboxypeptidase A und B und Pronase wurde weder das native noch das Apoprotein beeinträchtigt. Ebenfalls wurde hier die thermische Stabilität durch Enzymaktivitätsmessungen untersucht, wobei eine Erhöhung der Stabilität nach Hinzufügen von Cu^{2+} und Co^{2+} bzw. Cu^{2+} und Hg^{2+} zu Apoprotein im Vergleich zum Cu,Zn-Protein beobachtet wurde. Andere Metallionen wie Mg^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} und Ni^{2+} hatten keinen Einfluß auf die thermische Behandlung von Apoerythrocuprein mit oder ohne Cu^{2+}. Auch die pH-Stabilität des Proteins ist eindeutig vom Metallgehalt abhängig, wie durch UV-Spektroskopie festgestellt wurde. Dabei blieb das Absorptionsspektrum des Apoproteins zwischen pH 2,5 und 9,5 erhalten (55). Beim nativen Erythrocuprein war dies zwischen pH 2,0 und 12,0 der Fall (13); pH-Werte über 12 führen zum Verlust der enzymatischen Aktivität (152).

4.3 Enzymatische Aktivität der Metall-Apoerythrocuprein-komplexe

Der Unterschied von Superoxid-Dismutaseaktivität und Singulett-Sauerstoff-Dekontaminationsaktivität ist beachtlich. Die Reaktivität von nativem Erythrocuprein ist im letzteren Fall ungefähr zehnmal höher als im SOD-Test und beweist damit die extrem hohe Spezifität der Cupreine für diese enzymatische Reaktion (108, 157). Sogar Apoprotein, bei dem durch Atomabsorptions- und ESR-Spektroskopie kein Kupfer mehr nachgewiesen werden

konnte, besaß noch ~1% Aktivität, verglichen mit dem nativen Protein. Es wird vermutet, daß geringste Spuren von Kupfer im Protein der Grund dafür sind. Die Tatsache, daß das 1Cu-Apoenzym halb so viel Aktivität zeigt wie das mit 2 und mehr gAtomen/Mol Protein versetzte Produkt und daß Zink praktisch keinen Einfluß hatte, erlaubt eine klare Aussage. Danach ist ausschließlich Kupfer für die enzymatische Aktivität verantwortlich und hier wiederum nur das an der ursprünglichen Bindungsstelle im Protein gebundene Cu^{2+}. Im Überschuß zugegebenes Cu^{2+} bewirkt keine Aktivitätssteigerung mehr.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der unspezifischeren Superoxid-Dismutaseaktivität mit vergleichbaren Komplexen. Hier ist noch eine zunehmende Hemmung der Cytochrom c-Reduktion durch Zink und Kupfer beim 1-, 2- und 3-Cu-Apoprotein festzustellen. Das bedeutet, daß Zink als strukturelle Komponente auf das aktive Zentrum in der Weise einwirkt, daß das Kupfer in eine optimale Lage gelangt bzw. durch Zn^{2+} von unspezifischen Bindungsstellen verdrängt und in das aktive Zentrum gebracht wird. Proteingebundenes Zn^{2+} alleine besitzt wie das Apoprotein keine Aktivität. Zusätzliches Cu^{2+} könnte evtl. die Rolle des Zn^{2+} übernehmen oder durch Komplexbildung mit verschiedenen Aminosäureresten, z.B. Lysin und/oder Histidin, die ja auch SOD-Aktivität zeigen (61), die Gesamtaktivität erhöhen.

Durch die außergewöhnlich hohe Spezifität des Enzyms könnte man annehmen, daß Singulett-O_2 das eigentliche Substrat für die Cupreine darstellt, da dieser auf Grund seiner Toxizität in der Zelle besonders schnell unwirksam gemacht werden muß. Da niedermolekulare Cu-Komplexe eine kaum bedeutsame Aktivität aufweisen, muß die Komplexbindung des Metallions im Protein besonders beschaffen sein. Eine Erklärung dafür läßt sich in dem "entatic state" des Kupferions im Proteinverband finden. Diese Annahme läßt sich auf alle Metallenzyme ausdehnen.

Man erkennt durch die Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse, daß durch die Fähigkeit des Erythrocupreins, Singulett-O_2 abzufangen, das Enzym für die aerobe Zelle einen unentbehrlichen Schutzmechanismus gegen Lipidoxidation der Membranen, für ungesättigte Verbindungen und Nucleinsäuren darstellt. Die Superoxid-Dismutaseaktivität scheint dagegen eine Nebenwirkung des Metallenzyms zu sein (157).

4.4 Kobalt-Erythrocuprein

Der Austausch des Zinks gegen Kobalt im Erythrocuprein führte mit Hilfe einer Säulentechnik in 8 - 10 Stunden zu einem zwischen 80 und 90% durch Kobalt ausgetauschten Produkt ohne erkennbaren Kupferverlust.

Calabrese, Rotilio und Mondovi berichteten von einem Kobalt-Erythrocuprein, bei dem durch 36-stündige Dialyse

gegen $CoCl_2$ 60% Kobalt bei einem Rest-Zinkgehalt von 40% eingebaut wurde. Volle Substitution wurde erst in Gegenwart von 2 M Guanidin erreicht, was aber zu einem instabilen Protein führte (123).
Die Säulenmethode zeigt auch hier wie bei der Präparation des Apoerythrocupreins deutlich verschiedene Vorteile gegenüber der Dialysetechnik. Einerseits ist die Austauschrate wesentlich höher und andererseits spielt der Zeitfaktor eine nicht unbedeutende Rolle. Neben der Zeitersparnis wird das Protein unter den Austauschbedingungen durch den kürzeren Vorgang schonender behandelt.
Das Cu/Co-Enzym besitzt die volle Superoxid-Dismutaseaktivität wie das unbehandelte Enzym, woraus man schließen kann, daß durch die Co-Substitution die Enzymfunktion und damit wahrscheinlich die Proteinkonformation nicht beeinträchtigt wird. Dies steht auch im Einklang mit den unveränderten chiroptischen Eigenschaften unterhalb 260 nm und dem Verhalten des modifizierten Proteins im elektrischen Feld. Die elektrophoretischen Eigenschaften im Polyacrylamid-Gel sind mit und ohne Natriumdodecylsulfat identisch mit denen des nativen Cupreins.
Die geringe Menge an Zink, die noch nachzuweisen war (0,25 - 0,375 gAtome/Mol Protein), entspricht 10 - 20% des ursprünglich enthaltenen Zinks und ist ungefähr dem Zinkverlust umgekehrt proportional.

Daraus, und weil praktisch kein Kupferverlust nachzuweisen war, kann man annehmen, daß das Kobalt dieselben Bindungsstellen im Erythrocuprein besetzt wie zuvor das Zink.

Während im UV-Spektrum des Cu/Co-Proteins keine Veränderungen im Vergleich zum Cu/Zn-Protein feszustellen sind, zeigt das sichtbare Spektrum eine starke Co-Absorption im Bereich von 500 - 600 nm. Der molare Extinktionskoeffizient des Peaks bei 598 nm beträgt 920. Ähnlich liegen die Absorptionsverhältnisse beim 2Co-Apoprotein, wo das Maximum bei 588 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von 950 besitzt. Der Peak bei 570 nm ist hier als Schulter ausgeprägt. Insgesamt kann man demnach auf Grund der ähnlichen optischen Eigenschaften ein weitgehend übereinstimmendes Bindungsverhalten von Co in den beiden Co-Proteinen vermuten. Das Ausbleiben einer Absorptionszunahme bei 598 bzw. 588 nm durch Zugabe weiterer Co(II)-Ionen ist eindeutig auf das Vorhandensein von nur zwei Bindungsstellen für Co^{2+}/Mol Protein zu erklären. Dieses Ergebnis wurde auch von Fee zusätzlich durch polarographische Titration von Apoerythrocuprein mit Co(II) bestätigt (42). Der Befund steht im Einklang mit dem in (3.7) erhaltenen stöchiometrischen Verhältnis des durch Dialyse gegen Co^{2+} bzw. Zn^{2+} hergestellten 2Co- und 2Zn-Apoproteins. Bei kompetitivem Angebot von stöchiometrischen Mengen an Co^{2+} und Zn^{2+} wird ausschließlich Zn^{2+} von dem Apoerythrocuprein aufgenommen.

Die Absorptionsspektren des Cu/Co- und des Co-Proteins besitzen eine überraschende Ähnlichkeit mit dem Spektrum des Cyanid-Komplexes der Co(II)-Carboanhydrase. Bei dem Komplex wird eine verzerrte tetraedrische Symmetrie mit 3 Proteinliganden vermutet (20, 52, 82). Das Anion besetzt die vierte Ligandenstelle, die auch von H_2O eingenommen werden kann.
Das CD-Spektrum hat jedoch einen entgegengesetzten Cottoneffekt und das Intensitätsverhältnis der beiden aufgelösten Banden ist unterschiedlich (20). Aus MCD-Studien des Co-Erythrocuprein und des erwähnten Cyanid-Co(II)-Carboanhydrasekomplexes wird aber geschlossen, daß die Zink-Bindungsstellen in beiden Enzymen ähnlich oder sogar identisch sind. Es werden deshalb evolutionsbedingte Zusammenhänge vermutet (125).
Die Absorption bei 680 nm ist beim Cu/Co-Erythrocuprein deutlich erniedrigt, was von Wechselwirkungen der Metallionen Cu^{2+} und Co^{2+} herrühren muß. Gibt man zu dem 2Co-Apoprotein äquimolare Mengen an Cu^{2+}, so findet man jedoch fast die normale Cu^{2+}-Absorption mit einem ausgeprägten Maximum bei 680 nm. Fee hat einige Eigenschaften dieses mit Cu und Co versetzten Apoproteins beschrieben (42). Die Metall-Metall-Wechselwirkung scheint bei diesem Produkt weniger ausgeprägt zu sein.

Eine starke gegenseitige Beeinflussung von Cu und Co ist auch aus dem CD-Spektrum ersichtlich. Neben dem Co(II)-Cottoneffekt bei 520 nm ist eine Verminderung der Cu(II)-

Absorption im Bereich von 600 nm festzustellen. Außerdem tritt bei 345 nm eine energiereiche aufgelöste Absorptionsbande auf, die auch von Cu(II)-Übergängen ausgelöst werden muß. Im Vergleich zum Cu/Zn-Protein, wo sich hier nur eine Schulter befindet, ist die Intensität um den Faktor zwei erhöht (Θ-Wert: +7200 gegenüber +3500). Rotilio, Calabrese und Coleman (125) sowie Fee (42) finden bei 345 nm etwa vergleichbare Intensitäten der Cottoneffekte beim Cu/Co- und beim Cu/Zn-Protein. Dies ist im ersten Fall möglicherweise durch die unvollständige Substitution von Zn durch Co zu erklären, im zweiten Fall vielleicht dadurch, daß das 2Cu,2Co-Protein aus Apoerythrocuprein hergestellt wurde. Die gleichbleibenden Cottoneffekte bei 260 nm und im Bereich von 210 nm deuten darauf hin, daß keine konformativen Veränderungen eingetreten sind.

Zur weiteren Untersuchung der Bindung des Co im Co-Erythrocuprein wurden ESR-Messungen bei -160°C durchgeführt. Hier zeigte sich jedoch ein vollständiger Verlust des Cu(II)-Signals und zudem kein Co(II)-Signal. Dieses Ergebnis ließ entweder eine außerordentlich starke Wechselwirkung durch Spin-Spin-Paarung der Cu- und Co-Kerne, oder eine Oxidation des Co^{2+} zu Co^{3+} bei gleichzeitiger Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} vermuten. Letzteres konnte auf Grund der optischen- und CD-Spektren und dadurch ausgeschlossen werden, daß im 2Co-Apoprotein in gleicher Weise das Co(II)-Signal ausblieb,

obwohl Co in der Oxidationsstufe + II vorliegen musste. Es liegt offenbar durch eine enge Nachbarschaft aller 4 Metallionen ($2Cu^{2+}$, $2Co^{2+}$) bzw. 2 Metallionen im 2Co-Apoerythrocuprein eine Spin-Spin-Kopplung vor, durch die eine Neutralisation der paramagnetischen Eigenschaften eintritt und das Zustandekommen eines ESR-Signals verhindert wird. Auch die Behandlung mit 4 M Harnstoff und Guanidin, um das Proteinmolekül aufzufalten und den Abstand der Metallionen untereinander zu vergrößern, blieb erfolglos. Dadurch könnte man annehmen, daß Cu und Co bzw. Zn möglicherweise einen gemeinsamen Liganden besitzen. Die Reduktion von Cu(II) mit Ferrocyanid, Dithionit und Mercaptoäthanol zum Cu(I)/Co(II)-Protein sollte den paramagnetischen Beitrag des Kupfers ausschalten und dadurch ein Co(II)-ESR-Signal ermöglichen. Das Produkt war jedoch vergleichbar mit dem 2Co-Apoerythrocuprein und wie dieses ESR-inaktiv. Die ESR-Meßtemperaturen scheinen dabei von entscheidender Bedeutung zu sein. Rotilio erhielt mit dem reduzierten Cu/Co-Protein bei 1,5°K ein Co-Signal mit einem g-Wert von 4,6, der einer tetraedrischen Form des Co(II) zugeschrieben werden kann (123). Fee konnte mit dem aus Co und Apoprotein und Cu,Co und Apoprotein hergestellten Produkt bei 20°K ein Co(II)-Signal im Bereich von $g = 4$ feststellen, nachdem Cu reduziert wurde (42). Die Art der Wechselwirkung ist bis jetzt unbekannt.

Die Bindung von Anionen an Co im Co-Erythrocuprein wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (42, 123). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Co nicht mit Anionen reagiert und ebensowenig von Lösungsmitteleinflüssen beeinträchtigt wird. Eine neue Arbeit über NMR-Relaxationsmessungen von Co-Erythrocuprein bestätigt diese Vermutung (118).

Die Informationen, die durch die Untersuchung des Co-Erythrocupreins erhalten wurden, können sicher auf das Zink übertragen werden. Sie erhärten die bisher angenommene Meinung, daß Zink in erster Linie eine strukturelle Funktion hat, die vielleicht durch die direkte Nachbarschaft oder durch Konformationsänderungen die Cu-Bindungsstelle beeinflussen kann.

4.5 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Es wurde angenommen, daß durch die Anwendung der Röntgenphotoelektronenspektroskopie Aussagen über die Bindungsverhältnisse der Metallionen in verschiedenen Metall-Apoerythrocupreinkomplexen und dem Kobalt-Erythrocuprein erhalten werden können (66, 67). An nativem Protein wurde eine starke Erniedrigung der Bindungsenergie des Cu-$2p_{3/2}$-Signals gegenüber niedermolekularen Cu(II)-Komplexen gefunden (ca. 2,0 eV). Sogar bei Zink, bei dessen $2p_{3/2}$-Signal sonst nur wenig ausgeprägte chemische Verschiebungen auftreten, konnte eine um 1 eV niedrigere Bindungsenergie festgestellt werden. Außer-

dem ergab sich ein Intensitätsunterschied der beiden Signale von 1 : 2,8 (Cu : Zn), woraus geschlossen wird, daß das Zink mehr im Inneren des Proteins sitzt und deshalb ein Teil der von ihm emittierten Photoelektronen absorbiert wird. Kupfer dagegen befindet sich in den Randzonen des Erythrocupreins (65). Damit ließe sich die extrem kurze Verweilzeit von H_2O am Kupfer (49) und die hohe O_2^--Umsatzrate von $2 \times 10^9\ M^{-1}\ sec^{-1}$ (120) erklären.

Das Cu-Apoprotein zeigt eine um 0,7 eV erhöhte Bindungsenergie des Kupfers gegenüber dem nativen Protein. Ob dieser Effekt auf das überschüssige Cu (3,1 gAtome/Mol) zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden. Dennoch ist die chemische Verschiebung im Vergleich zu niedermolekularen Cu(II)-Komplexen deutlich zu erkennen. Der Überschuß macht sich überraschenderweise im Spektrum durch das Auftreten eines zweiten Cu-Signals nicht bemerkbar, obwohl unterschiedlich gebundene Kupferionen erwartet werden sollten. Ähnlich ist die Situation beim Zn-Apoprotein, wo allerdings nur ein geringer Überschuß von 0,5 Zn/Mol zu verzeichnen ist.
Man könnte annehmen, daß die Zinkionen die Stelle der beiden Zinkionen im nativen Protein einnehmen.
Im Gegensatz zum nativen Erythrocuprein zeigt sich jedoch hier kein Intensitätsunterschied in den Signalen der beiden Metallionen Cu^{2+} und Zn^{2+}. Möglicherweise

liegt im Zn-Apoprotein eine reversible Konformationsänderung vor, wobei das Zink noch nicht in dem Maße in die Proteinumgebung eingebettet ist wie in Gegenwart von Kupfer. Daher könnte auch die um 1 eV unterschiedliche Bindungsenergie kommen, die auf ein anders aussehendes Ligandenfeld um die Zinkionen als im nativen Protein hindeutet. Das veränderte Cu(II)-Signal des Cu-Apoproteins, das, wie oben erwähnt, eine Verschiebung nach höheren Bindungsenergien erfährt, wäre in gleicher Weise auch durch geringe strukturelle Abweichungen durch das Fehlen von Zink zu erklären. Dies würde mit dem Befund übereinstimmen, daß Cu und Zn in enger Nachbarschaft zueinander liegen und vielleicht über einen gemeinsamen Proteinliganden miteinander in Verbindung stehen.

Das Auftreten von zwei aufgelösten, 4 eV auseinanderliegenden Co-Signalen gleicher Intensität beim Co-Apoerythrocuprein läßt sich durch verschieden gebundenes Kobalt erklären. Auch hier wurde ein Überschuß von 1,1 Co/Mol nachgewiesen. Es ist auch möglich, daß das Signal bei 282,2 eV von einem Co-Aquokomplex, der die gleiche Bindungsenergie aufweist, herrührt. Das breite, nicht aufgelöste Co-Signal des Co-Erythrocupreins, das sich von 781 - 790 eV erstreckt, kann außer von chemisch oder magnetisch verschiedenen Kobaltionen auch von Rumpfpolarisationseffekten, von Elektronenaustauschwechselwirkungen zwischen ungepaarten Valenzelektronen und den Elektronen der inneren Schalen herrühren.

Das Cu-$2p_{3/2}$-Signal dieses modifizierten Proteins ist verändert und um 0,7 eV nach höheren Bindungsenergien verschoben, obwohl sich das Cu bei dem vorliegenden Produkt an seiner unveränderten Bindungsstelle befinden sollte (es wurde nur Zink ausgetauscht). Dieser Effekt deutet, wie schon durch andere Methoden, wie optische , CD- und ESR-Spektroskopie festgestellt wurde, auf starke Wechselbeziehungen zwischen Kupfer und Kobalt hin.

Eine Beteiligung von Schwefel an der Metallbindung konnte in keinem der gemessenen Proteine nachgewiesen werden, was aus der Bindungsenergie des S 2p-Niveaus von 163,0 $\pm$ 0,2 eV geschlossen wird. Sowohl mit Zink- als auch mit Cadmium-Verbindungen des Cysteins und Cystins war bei Vorliegen einer Metall-Schwefelbindung ein S-2p-Signal von 162,0 $\pm$ 0,3 zu beobachten (67). Die bei den Proteinproben erhaltenen Schwefel-Signale sind ausschließlich dem Cystein, Cystin und Methionin zuzuschreiben.

Die Interpretation der Röntgenphotoelektronenspektroskopie wirft zur Zeit noch große Probleme auf, insbesondere was die Anwendung des Verfahrens auf Proteine, die erst begonnen hat, betrifft. Vorläufig werden in erster Linie vergleichende Untersuchungen gemacht, wobei vielfach niedermolekulare Aminosäurekomplexe herangezogen werden. Man muß sich allerdings im klaren sein,

daß solche Verbindungen nur bedingt als Modell für Metallproteine dienen können. Dabei geht man von der Voraussetzung aus, daß ähnliche Bindungsenergien auf eine ähnliche chemische Umgebung hinweisen.
Vor allen Dingen macht die quantitative Auswertung der Methode noch große Schwierigkeiten. Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, wäre es nötig, alle Prozesse, die zur Abweichung der Linienintensitätsverhältnisse führen, genau zu erkennen. Es ist aber auch möglich, quantitative Analysen anhand von Eichkurven durchzuführen (132).

4.6 Polyäthylenimin-Histidin-Cu(II)-Komplex

Obwohl die Synthese eines Polyäthylenimin-Histidin-Kupferkomplexes gelungen war, blieb die Substanz ohne deutlich erkennbare enzymatische Aktivität, die in der Größenordnung vergleichbar mit niedermolekularen Cu(II)-Komplexen lag.
Dieses Ergebnis zeigt, daß die Voraussetzungen für eine reaktive Cu-Bindung nicht erfüllt wurden, nämlich, daß mindestens eine Koordinationsstelle des Kupferions für die Substratbindung frei bleibt. Vielmehr dürfte eine vollständige Komplexierung durch die im Polymeren in einer Vielzahl vorhandenen Liganden eingetreten sein. Durch eine derartige Blockierung der Kupfer-Koordinationsstellen ist folglich keine enzymatische Aktivität möglich.

Sigel untersuchte verschiedene Cu-Komplexe auf ihre katalatische und peroxidatische Aktivität und konnte zeigen, daß eine oder zwei Koordinationsstellen des Kupfers für das Substrat zugänglich sein müssen (133). Ähnlich kann man sich die Verhältnisse beim Erythrocuprein vorstellen. Anionenaustauschversuche an der vierten Koordinationsstelle des Kupfers bestätigen diese Vermutung (49, 122). Die kurze Verweilzeit des Wassers erfordert zusätzlich, daß das Kupfer von $O_2^{\cdot-}$ und/oder Singulett-Sauerstoff gut zugänglich sein muß. Diese Bedingung wird von Erythrocuprein erfüllt, da Cu in den Randzonen des Proteins sitzt, was aus Röntgenphotoelektronenspektroskopie-Untersuchungen gefolgert wird (65).

Von Sokolowski (134) wurde ein Copolymerisat aus Glycin, Tyrosin und Lysin synthetisiert, das mit Cu^{2+} in einigen spektroskopischen Eigenschaften dem Erythrocuprein ähnelte. Es wies aber ebenfalls keine signifikante enzymatische Aktivität auf.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Cuprein aus Rindererythrozyten wurde als monodisperses Protein isoliert. Neben den üblichen Homogenitätskriterien diente die Kristallisation des Cu,Zn-Proteins als zusätzliches Reinheitskriterium. Zwei Kristallformen traten dabei auf:

a) Wärmelabile, orthorhombische Kristalle mit einer Kantenlänge von 0,35 ± 0,1 mm aus einer gesättigten wässrigen Proteinlösung.

b) Monokline Kristalle mit Kantenlängen bis 0,5 mm aus verdünnten Proteinlösungen in wässrigem 2-Methylpentandiol (2,4).

Aus dem nativen Metallprotein wurden die Cu^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen mit EDTA mit Hilfe der Gelfiltrationstechnik entfernt.

Während der Präparation des Apoerythrocupreins konnte durch Zusatz und Trennung von ^{14}C-EDTA eine EDTA-Kontamination ausgeschlossen werden.

Aus Apoerythrocuprein wurde mit Cu^{2+} und Zn^{2+} durch verschiedene Methoden ein vollständig rekonstituiertes Protein erhalten, das sich lichtabsorptions-, CD- und ESR-spektroskopisch, elektrophoretisch und in der biologischen Aktivität nicht vom nativen Erythrocuprein unterschied.

Partiell und vollständig rekonstituierte Cupreine wurden auf ihre Singulett-Sauerstoff dekontaminierende

Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß, im Gegensatz zur Superoxid-Dismutaseaktivität, ausschließlich 2 Cu/Mol Protein zum Erreichen der vollen Aktivität notwendig sind. Weitere Mengen an Cu und Zn bewirkten keine Aktivitätserhöhung.
Der Einfluß von Cu und Zn auf die thermische Stabilität des Apoerythrocupreins wurde elektrophoretisch ermittelt. Beide Metallionen zusammen in äquimolaren Mengen vermochten ein ebenso stabiles Produkt zu bilden, wie es das native Protein ist, wobei Cu den höchsten Stabilitätsbeitrag liefert. Zn hatte eine zusätzliche stabilisierende Wirkung. Überraschenderweise erwies sich der Zn-Apoerythrocupreinkomplex vergleichsweise thermisch weniger stabil gegenüber dem Apoprotein.

Aus nativem Erythrocuprein konnte mit Hilfe der Gelfiltrationstechnik Zink zu 80 bis 90% gegen Kobalt(II) ausgetauscht werden. Das Cu/Co-Protein hatte die volle Superoxid-Dismutaseaktivität und dasselbe elektrophoretische Verhalten wie das unbehandelte Protein. Eine charakteristische Co(II)-Absorption mit Maximum bei 598 nm deutet auf eine tetraedrische Umgebung des Metallions hin. Das Verschwinden des Cu(II)-ESR-Signals und das Ausbleiben eines Co(II)-Signals auch bei Reduktion des Cu(II) zu Cu(I) läßt auf starke Wechselwirkungen und enge Nachbarschaft der beiden Metallionen schließen. Ein verändertes CD-Spektrum bezüglich des Cu und eine

durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie gemessene veränderte Cu-Bindungsenergie (932,6 eV gegenüber 931,9 eV) erlauben die gleiche Aussage. Ein breites, nicht aufgelöstes Co-Signal ist ebenfalls ein Hinweis dafür.
Das Co-Apoprotein weist zwei aufgelöste Co-Signale mit einer starken chemischen Verschiebung gegenüber den Co-Aminosäurekomplexen auf. Es läßt sich aber nicht entscheiden, worauf dieser Effekt zurückzuführen ist.
Das Cu-Signal im Cu-Apoprotein und das Zn-Signal im Zn-Apoprotein zeigen abweichende Werte vom nativen Erythrocuprein und lassen vermuten, daß das Ligandenfeld durch das Fehlen des Zinks bzw. Kupfers anders als im nativen Protein aussieht.
Schwefel ist nicht an der Bindung zum Metall beteiligt.

Aus Polyäthylenimin und BOC-DNP-Histidin wurde durch Peptidverknüpfung ein Produkt synthetisiert, das als Modell für Erythrocuprein dienen sollte. Es wies mit Cu(II) keine signifikante enzymatische Aktivität auf. Damit scheint eine gewisse biochemische Spezifität für das native Erythrocuprein gerechtfertigt.

Literatur

1) Ardon,M., "Oxygen", Benjamin Press, New York, 1965

2) Arneson,R.M., (1970) Arch. Biochem. Biophys. 136, 352 - 360

3) Asada,K., Urano,M., Takahashi,M., (1973) Eur. J. Biochem. 36, 257 - 266

4) Bailey,J.L., "Techniques in Prot. Chem.", Elsevier Publ., Amsterdam - New York - London p. 341, 1967

5) Ballou,D., Palmer,G. und Massey,V., (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 898 - 904

6) Bannister,J., Bannister,W. und Wood,E., (1971) Eur. J. Biochem. 18, 178 - 186

7) Bannister,W.H., Salisbury,C.M. und Wood,E.J., (1968) Biochim. Biophys. Acta 168, 392 - 394

8) Bannister,W.H., Dalgleish,D.G., Bannister,J.V., Wood,E.J., (1972) Intern. J. Biochem. 3, 560 - 568

9) Bayer,E., Eckstein,H., Hagenmaier,H., Josef,D., Koch,J., Krauss,P., Roeder,A. und Schretzmann,P., (1969) Eur. J. Biochem. 8, 33 - 49

10) Bayer,E. und Schretzmann,P., Structure and Bonding, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1967, Vol. 2, 181 - 250

11) Behnke,D., Vallee,B.L., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2442 - 2445

12) Bohnenkamp,W. und Weser,U., (1972) Intern. Congress of Biophysics, Moskau, Abstracts 2, 101 EVIb 3/9

13) Bohnenkamp,W., Dissertation,Tübingen 1973

14) Bremser,W., (1971) Chemiker Ztg. 95, 819 - 832

15) Bremser,W., (1973) Topics in Current Chemistry 1, 1

16) Calabrese,L., Rotilio,G. und Mondovi,B., (1972) Biochim. Biophys. Acta 263, 827 - 829

17) Carrico,R.J. und Deutsch,H.F., (1969) J. Biol. Chem. 244, 6087 - 6093

18) Carrico,R.J. und Deutsch,H.F., (1970) J. Biol. Chem. 245, 723 - 727

19) Chan,H.W.S., (1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 2357-2358

20) Coleman,J.E. und Coleman,R.V., (1972) J. Biol. Chem. 247, 4718-4728

21) Coleman,J.E.,(1971) Progr. Bioorg. Chem.1, 159-344

22) Coleman,J.E.,(1967) J. Biol. Chem. 242, 5212-5219

23) McCord,J.M. und Fridovich,I., (1968) J. Biol. Chem. 243, 5733-5760

24) McCord,J.M. und Fridovich,I., (1969) J. Biol. Chem. 244, 6049-6055

25) McCord,J.M. und Fridovich,I., (1969) J. Biol. Chem. 244, 6056-6063

26) Cotton,F.A. und Wilkinson,G., "Anorganische Chemie" Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße, 1. Aufl. 1967, S. 807-820

27) Cramer,F., von der Haar,F., Holmes,K.C., Saenger,W., Schlimme,E. und Schulz,G.E., (1970) J. Mol. Biol. 51, 523 -530

28) Czapski,G.H. und Dorfmann,L.M., (1964) J. Phys. Chem. 68, 1169 - 1177

29) McDonagh,A.F., (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1306 - 1311

30) DeLuca,M. und Dempsey,M.E., (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 117 - 122

31) Dickerson,R.E., (1972) Scientific American 226, 4 58 -72

32) Dunker,A.K. und Rueckert,R.R., (1969) J. Biol. Chem. 244, 5074 -5080

33) Elwell,W.T. und Gidley,J,A.F., "Atomic Absorption Spectrophotometry", Pergamon Press, Oxford 1966 S. 88, 89, 129 - 131

34) Fallab,S., (1967) Angew. Chem. 79, 500 - 511

35) Feder,J. und Garret,L.G., (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 943 - 948

36) Fee,J.A. und Gaber,B.P., The second international Symposium on Oxidases and related redox Systems, Memphis, Tennesee1971, organized by T.E.King, H.S.Mason, und M.Morrison, im Druck

37) Fee,J.A. und Gaber,B.P., (1972) J. Biol. Chem. 247, 60 -65

38) Fee,J.A. und Teitelbaum,D., (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 150 - 157

39) Fee,J.A., (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 87 - 95

40) Fee,J.A., Natter,R. und Baker,G.S., (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 87 - 95

41) Fee,J.A., (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 107 - 116

42) Fee,J.A., (1973) J. Biol. Chem. 248, 4229 - 4234

43) Finazzi-Agro',A., Giovagnoli,C., Del Sole,P., Calabrese,L., Rotilio,G. und Mondovi,B., (1972) FEBS Letters 21, 183 - 185

44) Forman,H.J., Evans,H.J., Hill,R.L. und Fridovich,I., (1973) Biochemistry 12, 823 - 827

45) Forman,H.J. und Fridovich,I., (1973) J. Biol. Chem. 248, 2645 - 2649

46) Freeman,H.C., (1967) Advances in Protein Chemistry 22, 257 - 424

47) Fridovich,I., Metalloenzyme Conference, Oxford 1972 Abstr. Commun. p. 22 - 24

48) Fridborg,K., Kannan,K.K., Liljas,A., Lundin,J., Strandberg,B., Strandberg,R., Tilander,B. und Wrien,G., (1967) J. Mol. Biol. 25, 505 - 514

49) Gaber,B.P., Brown,R.D., Koenig,S.H. und Fee,J.A., (1972) Biochim. Biophys. Acta 271, 1 - 5

50) George,P. in: Oxidases and related Redox Systems, p. 3 (T.E.King, H.S.Mason and M.Morrison, eds.), J.Wiley, Inc., New York 1965

51) Goscin,S.A. und Fridovich,I., (1972) Biochim. Biophys. Acta 289, 276 - 283

52) Grell,E.H. und Bray,R.C., (1971) Biochim. Biophys. Acta 236, 503 - 506

53) Griffith,J.S., (1956) Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 235, 23

54) Griffith,J.S., "Oxygen in the animal organism", p. 141, Pergamon Press Oxford 1964

55) Hartmann,H.J., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1971

56) Hartz,J.W. und Deutsch,H.F., (1969) J. Biol. Chem. 244, 4565 - 4572

57) Hartz,I.W., Ph. D. Thesis, University of Wisconsin 1968

58) Hemmerich,P. und Sigwart,C., (1963) Expirentia 19, 488

59) Hodgson,E.K. und Fridovich,I., (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 270 - 274

60) Hughes,M.N., "The Inorganic Chemistry of Biological Processes", J.Wiley, Inc.,London-New York-Sydney-Toronto 1972

61) Joester,K.E., Jung,G., Weber,U. und Weser,U. (1972) FEBS Letters 25, 25 - 28

62) Jung,G., persönliche Mitteilung

63) Jung,G., Weser,U. und Voelter,W., (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 720

64) Jung,G., Ottnad,M., Bohnenkamp,W. und Weser,U., (1972) FEBS Letters 25, 346-348

65) Jung,G., Ottnad,M., Bremser,W., Bohnenkamp,W. und Weser,U., (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 77 - 86

66) Jung,G., Ottnad,M., Bremser,W., Hartmann, H.J. und Weser,U., (1973) Z. Physiol. Chem. 354, 341 - 343

67) Jung,G., Ottnad,M., Hartmann,H.J., Rupp,H. und Weser,U., (1973) Z. Anal. Chem. 263, 282 - 285

68) Isaka,S., (1957) Nature (London) 179, 578 - 579

69) Kägi,J.H.R. und Vallee,B.L., (1960) J. Biol. Chem. 235, 3188 - 3192

70) Keele,B.B., McCord,J. und Fridovich,I., (1971) J. Biol. Chem. 246, 2875 - 2880

71) Kendrew,J.C., Dickerson,R.E., Strandberg,B.E., Hart,R.C., Davies,D.R., Phillips,D.C. und Shore,V.C., (1960) Nature 185, 422 - 427

72) Kiefer,H.C., Congdon,W.I., Scarpa,I.S. und Klotz,I.M., (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2155 - 2159

73) Kimmel,J.R., Markowitz,H. und Brown,D.M., (1959) J. Biol. Chem. 234, 46 - 50

74) Klotz,I.M., Garfield,P.R. und Sioniewsky,A.R., (1969) Biochemistry 8, 4752 - 4756

75) Klug,D., Rabani,J. und Fridovich,I., (1972) J. Biol. Chem. 247, 4839 - 4842

76) Kramer,E.N. und Klein,M.P., "Electron Spectroscopy", North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1972 p. 733 - 751

77) Lahey,M.E., Gubler,C.J., Cartwright,G.E. und Wintrobe,M.M., (1953) J. Clin. Invest. 32, 322 - 331

78) Latt,S.A., Vallee,B.L., (1971) Biochemistry 10, 4263 - 4270

79) Leibfritz,D., (1972) Angew. Chemie 84, 156 - 158

80) Lindskog,S., (1963) J. Biol. Chem. 238, 945 - 951

81) Lindskog,S., Structure and Bonding, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970, Vol. 8 153 - 196

82) Lindskog,S. und Ehrenberg,A., (1967) J. Mol. Biol. 24, 133

83) Lipscomb,W.N., Coppola,J.C., Hartsuck,J.A., Ludwig,M.L., Muirhead,H., Searl,J. und Stock,T.A., (1966) J. Mol. Biol. 19, 423

84) Lipscomb,W.N., Hartsuck,J.A., Reeke,G.N., Quiocho,F.A., Bethge,P.H., Ludwig,M.L., Stertz,T.A., Muirhead,H. und Coppola,J.C., Brookhaven Symposia in Biology 1968, Abstract 21, p. 24

85) Lontie,R., Blaton,V., Albert,M., Peeters,B., (1965) Arch. Intern. Physiol. Biochim. 73, 150 - 152

86) Madhusudanan Nair,P. und Mason,H.S., (1967) J. Biol. Chem. 242, 1406 - 1415

87) Malkin,R. und Malmström,B.G., (1970) Adv. Enzymol. 33, 177 - 244

88) Malmström,B.G. und Vänngard,T., (1960) J. Mol. Biol. 2, 118

89) Mann,T. und Keilin,D., (1939) Proc. Roy. Soc. London, Ser. B 126, 303 - 315

90) Markowitz,H., Cartwright,G.E. und Wintrobe,M.M., (1959) J. Biol. Chem. 234, 40 - 45

91) Mason,H.S., Gould,D.C., "The Biochemistry of Copper" p. 35 - 37 (J.Peisach, P.Aisen and W.E.Blumberg, eds.), Academic Press London - New York 1966

92) Mason,R. und Zubieta,J.A., (1973) Angew. Chemie 85, 390 - 400

93) Massey,V., Strickland,S., Mayhew,S.G., Howell,L.G., Engel,P.C., Matthews,R.G., Schuman,M. und Sullivan,P.A., (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 891 - 897

94) Maurer,H.R., "Disk-Elektrophorese", Walter de Gruyter & Co., Berlin 1968

95) Meienhofer,J., (1962) Chimia 16, 385 - 424

96) Mirsa,H.P. und Fridovich,I., (1971) J. Biol. Chem. 246, 6886 - 6890

97) Mirsa,H.P. und Fridovich,I., (1972) J. Biol. Chem. 247, 188 - 192

98) Mirsa,H.P. und Fridovich,I., (1972) J. Biol. Chem. 247, 3170 - 3175

99) Mirsa,H.P. und Fridovich,I., (1972) J. Biol. Chem. 247, 3410 - 3414

100) Morpurgo,L., Giovagnoli,C. und Rotilio,G., (1973) Biochim. Biophys. Acta 322, 204 - 210

101) Mohamed,M.S. und Greenberg,D.M., (1954) J. Gen. Physiol. 37, 433 - 440

102) Neurath,H., "The Proteins", Vol. V, Academic Press, London - New York 1970

103) Nilsson,R., Pick,F.M., Bray,R.C. und Fielden,M., (1969) Acta Chem. Scand. 23, 2554

104) Nyman,P.O., (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 387 - 389

105) Ottnad,M., Chemische Diplomarbeit, Tübingen 1972

106) "Oxidases and related Redox Systems" (T.E.King, H.S.Mason and M.Morrison, eds.), J.Wiley, Inc. New York 1965

107) Paschen,W., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1972

108) Paschen,W. und Weser,U., (1973) Biochim. Biophys. Acta 327, 217 - 222

109) Perutz,M.F., Muirhead,H., Cox,J.M., Goaman,L.G., Matthews,F.S., McGandy,E.L. und Webb,L.E., (1968) Nature 219, 29 - 32

110) Porter,H. und Folch,J., (1957) J. Neurochem. 1, 260 - 271

111) Porter,H. und Ainsworth,S., (1959) J. Neurochem. 5, 91 - 98

112) Porter,H., Sweeny,M. und Porter,E., (1964) Arch. Biochem. Biophys. 105, 319 - 325

113) Prince,R.H. und Woolley,P.R., (1972) Angew. Chem. 84, 461 - 471

114) Rabani,J., Mulac,W.A. und Matheson,M.W., (1965) J. Phys. Chem. 69, 53 - 70

115) Rabani,J. und Nielsen,S.O., (1969) J. Phys. Chem. 73, 3736 - 3744

116) Rapp,U., Adams,W.C. und Miller,R.W., (1973) Can. J. Biochem. 51, 158 - 171

117) Richardson,D.C., Bier,C.J. und Richardson,J.S., (1972) J. Biol. Chem. 247, 6368 - 6369

118) Rigo,A., Terenzi,M., Franconi,C., Mondovi,B., Calabrese,L. und Rotilio,G., (1974) FEBS Letters 39, 154 - 156

119) Rotilio,G, Finazzi-Agro',A., Calabrese,L., Bossa,F., Guerrieri,P. und Mondovi,B., (1971) Biochemistry 10, 616 - 621

120) Rotilio,G., Bray,R.C. und Fielden,M.E., (1972) Biochim. Biophys. Acta 268, 605 - 609

121) Rotilio,G., Calabrese,L., Bossa,F., Barra,D., Finazzi-Agro',A. und Mondovi,B., (1972) Biochemistry 11, 2182 - 2187

122) Rotilio,G., Morpurgo,L., Giovagnoli,C., Calabrese,L. und Mondovi,B., (1972) Biochemistry 11, 2187 - 2192

123) Rotilio,G., Metalloenzyme Conference, Oxford 1972, Abstr. Commun. p. 24 - 26

124) Rotilio,G., Morpurgo,L., Calabrese,L. und Mondovi,B., (1973) Biochim. Biophys. Acta 302, 229 - 235

125) Rotilio,G., Calabrese,L. und Coleman,J.E., (1973) J. Biol. Chem. 248, 3855 - 3859

126) Samuel,D., "Biochemie des Sauerstoffs", S. 6 (B.Hess und H.J.Staudinger, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1968

127) Sawada,J., Ohyama,I., Yamazaki,I., (1972) Biochim. Biophys. Acta 268, 305 - 312

128) Schwyzer,R. und Rittel,W., (1961) Helv. Chim. Acta 44, 159 - 169

129) Shaltiel,S. und Fridkin,M., (1970) Biochemistry 9, 5122 - 5127

130) Shields,G.S., Markowitz,H., Klasen,W.H., Cartwright,G.E. und Wintrobe,M.M., (1961) J. Clin. Invest. 40, 2007 - 2015

131) Siegbahn,K., Nordling,C., Fahlman,A., Nordberg,R., Hamrin,K., Hedman,J., Johansson,G., Bergmark,T., Karlsson,S.E., Lindgreen,I., Lindberg,B.: In: ESCA; Atomic, molecular and solid state structure studied by means of elektron spectroscopy. Uppsala: Almquist and Wiksells 1967

132) Siegbahn,K. In: Electron spectroscopy, D.A.Shirley, ed., p. 15. Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1972

133) Sigel,H., (1969) Angew. Chem. 81, 161 - 171

134) Sokolowski,G., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1973

135) Staab,H.A., (1956) Angew. Chem. 23, 754

136) Stansell,M.J. und Deutsch,H.F., (1965) J. Biol. Chem. 240, 4299 - 4305

137) Stansell,M.J. und Deutsch,H.F., (1965) J. Biol. Chem. 240, 4306 - 4311

138) Stokes,A.M., Hill,H.A.O., Bannister,W.H. und Bannister,J.V., (1973) FEBS Letters 32, 119 - 123

139) Strahs,G. und Kraut,J., (1968) J. Mol. Biol. 35, 503 - 511

140) Symonyan,M.A. und Nalbandyan,R.M. (1972) FEBS Letters 28, 22 - 24

141) Thomas,G., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1970

142) Ulmer,D.D. und Vallee,B.L., Adv. in Chemistry, Ser. 100, p. 187 -217. R.F.Gould, ed., American chemical Society, Washington D.C. 1971

143) Vallee,B.L. und Williams,R.J.P., (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 498 - 505

144) Vance,P.G. und Keele,B.B. jr., (1972) J. Biol. Chem. 247, 4782 - 4786

145) Voelcker,G., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1971

146) Weitzel,G., Schneider,F. und Fretzdorff,A.M., (1957) Z. Physiol. Chem. 307, 23 - 35

147) Weser,U., Bunnenberg,E., Cammack,R., Djerassi,C., Flohé,L., Thomas,G. und Voelter,W., (1971) Biochim. Biophys. Acta 243, 203 - 213

148) Weser,U., (1971) Angew. Chemie 83, 939 - 940

149) Weser,U. und Hartmann,H.J., (1971) FEBS Letters 17, 78 - 80

150) Weser,U. und Voelcker,G., (1972) FEBS Letters 22, 15 - 18

151) Weser,U., Barth,G., Djerassi,C., Hartmann,H.J., Krauss,P., Voelcker,G., Voelter,W. und Voetsch,W., (1972) Biochim. Biophys. Acta 278, 28 - 44

152) Weser,U., Bohnenkamp,W., Cammack,R., Hartmann,H.J. und Voelcker,G., (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 1059 - 1068

153) Weser,U., und Bohnenkamp,W., (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 695 - 696

154) Weser,U., Fretzdorff,A.M. und Prinz,R., (1972) FEBS Letters 27, 267 - 269

155) Weser,U. und Paschen,W., (1972) FEBS Letters 27, 248 - 250

156) Weser,U., Prinz,R., Schallies,A., Fretzdorff,A.M., Krauss,P., Voelter,W. und Voetsch,W., (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 1821 - 1831

157) Weser,U., Structure and Bonding, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1973, Vol. 17, 1 - 63

158) Wood,E., Dalgleish,D. und Bannister,W., (1971) Eur. J. Biochem. 18, 187 - 193

159) Zimmermann,R., Flohé,L., Weser,U. und Hartmann,H.J., (1973) FEBS Letters 29, 117 - 120

Lebenslauf:

Am 8. 12. 1941 wurde ich als Sohn des Oberamtsrats Hermann Hartmann und seiner Frau Alma, geb. Glunz, in Weikersheim geboren.
In Backnang besuchte ich die Volksschule und trat im Frühjahr 1952 in das dortige Gymnasium über, wo ich im Februar 1962 das Abitur bestand.
Nach zwei Jahren Bundeswehr-Dienstzeit immatrikulierte ich mich im April 1964 an der Universität Tübingen für das Studienfach Biochemie. Im Herbst 1970 legte ich die Diplomprüfung ab und fertigte im folgenden eine Diplomarbeit über das Thema "Darstellung und Charakterisierung von Rinder-Apoerythrocuprein" an.
Von Januar 1972 bis Januar 1974 arbeitete ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Weser an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	G.Weitzel, F.Schneider, U.Weser
Anorganische Chemie:	W.Rüdorff
Organische Chemie:	E.Müller, E.Bayer, M.Hanack
Physikalische Chemie:	G.Kortüm, H.Mauser
Chem. Pflanzenphysiologie:	H.Metzner
Pharmakologie:	H.Remmer
Mikrobiologie:	H.Zähner, H.Diekmann
Anatomie:	K.Mörike
Botanik:	E.Bünning, B.Schwemmle
Zoologie:	K.G.Grell, V.Schwartz
Physik:	H.Krüger
Mathematik:	W.Schweizer

Druck: SPRINT-DRUCK GmbH
7 Stuttgart 30, Wiener Str. 117
Telefon 81 26 69

Druck: SPRINT-DRUCK GmbH
7 Stuttgart 30, Wiener Str. 117
Telefon 81 26 69